



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**CHEMICKÁ ANALÝZA ORGANICKÝCH REZIDUÍ V
ARCHEOLOGICKÝCH KERAMICKÝCH NÁDOBÁCH**

CHEMICAL ANALYSIS OF ORGANIC RESIDUES IN ARCHAEOLOGICAL CERAMIC VESSELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Aneta Bunžová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1168/2016 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Aneta Bunžová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Spotřební chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.**

Název bakalářské práce:

Chemická analýza organických reziduí v archeologických keramických nádobách

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše zaměřené na možnosti charakterizace organických reziduí v keramických nádobách z archeologických nálezů metodami chemické analýzy.
2. Návrh optimálních metod analýzy s přihlédnutím k dostupné analytické instrumentaci.
3. Analýza reálných vzorků a interpretace výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 31.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Aneta Bunžová
student(ka)

prof. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

podpis studenta

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému vedoucímu práce panu prof. Ing. Josefu Čáslavskému, Csc. za to, že mi dovolil věnovat se tématu, se kterým jsem za ním přišla. Hlavně za jeho velkou ochotu při analýzách a konzultacích naměřených dat a také za velmi lidský přístup. Dále bych chtěla poděkovat paní Ing. Ludmile Mravcové, Ph.D. za pomoc a konzultaci ohledně práce v laboratoři i při samotných analýzách.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá analýzou organických reziduí v archeologických keramických nádobách. Práce se vedle teoretické charakterizace reziduí zabývá možností jejich extrakce a následné analýzy, která je vyzkoušena na reálných vzorcích z archeologických nalezišť. V práci jsou k analýzám použita dvě různá derivatizační činidla pro následné stanovení pomocí techniky plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Práce se částečně snaží nastínit i možnou skladbu jídelníčku uživatelů analyzovaných keramických nádob.

Abstract

The presented bachelor thesis deals with the analysis of organic residues in archaeological ceramic vessels. Apart from theoretical characterisation of residues, the thesis focuses on the possibility of the extraction of residues and subsequent analysis, which is executed on real samples from archaeological sites. In the research, two different derivatization reagents were used for the subsequent determination using the technique of gas chromatography in combination with mass spectrometry (GC/MS). The thesis endeavours to certain extent to sketch the diet of the users of the analyzed ceramic vessels.

Klíčová slova

Organická rezidua, archeologické keramické nádoby, GC/MS, mastné kyseliny

Keywords

Organic residues, archaeological ceramic vessels, GC/MS, fatty acids

Obsah

1. ÚVOD	6
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.1 Archeologie a rezidua.....	7
2.1.1 Keramické nádoby.....	7
2.1.2 Rezidua.....	8
2.2 Analýza organických reziduí - Organic residue analysis (ORA)	9
2.2.1 Vznik, historie, současnost.....	9
2.2.2 Koncepce	10
2.3 Faktory ovlivňující stav a zachování organických reziduí	11
2.3.1 Nádoba	11
2.3.1.1 Nekeramické nádoby	11
2.3.1.2 Keramické nádoby	12
2.3.2 Prostředí	12
2.3.3 Manipulace po vyzvednutí	13
2.4 Biomolekuly identifikovatelné v reziduích	13
2.4.1 Lipidy	14
2.4.2 Proteiny	15
2.4.3 Ostatní	15
2.5 Detekce organických reziduí pomocí analytických metod.....	15
2.5.1 Výběr a odebrání vzorku a jeho homogenizace	16
2.5.2 Extrakce.....	17
2.5.3 GC/MS	18
2.5.4 IRMS	18
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Seznam použitých chemikálií a plynů	21
3.2 Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů	21
3.3 Vzorky	22
3.4 Homogenizace	22
3.5 Extrakce	23
3.6 Derivatizace	25

3.6.1	Methylace pomocí methanolického roztoku KOH.....	25
3.6.2	BSTFA	25
3.7	Analýza na GC/MS.....	27
4.	VÝSLEDKY	28
4.1	Vzorek č. 1 – Petrov_1	28
4.1.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	28
4.1.2	Silylace pomocí BSTFA.....	29
4.2	Vzorek č. 2 – Petrov_2	30
4.2.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	30
4.2.1	Silylace pomocí BSTFA.....	32
4.3	Vzorek č. 3 – Hruby_1	33
4.3.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	33
4.3.2	Silylace pomocí BSTFA.....	33
4.4	Vzorek č. 4 – Hruby_2	34
4.4.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	34
4.4.2	Silylace pomocí BSTFA.....	34
4.5	Vzorek č. 5 – Mikulčice_Valy.....	35
4.5.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	35
4.5.2	Silylace pomocí BSTFA.....	36
4.6	Vzorek č. 6 – Mikulčice_předhradí	37
4.6.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	37
4.6.2	Silylace pomocí BSTFA.....	38
4.7	Vzorek č. 7 – Tel Lachisch.....	39
4.7.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	39
4.7.2	Silylace pomocí BSTFA.....	40
4.8	Vzorek č. 8 – Ashkelon	41
4.8.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	41
4.8.2	Silylace pomocí BSTFA.....	42
4.9	Vzorek č. 9 – Pohansko	43
4.9.1	Methylace pomocí KOH v methanolu	43
4.9.2	Silylace pomocí BSTFA.....	44

5.	DISKUSE	45
6.	ZÁVĚR.....	47
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	48
8.	SEZNAM ZKRATEK.....	52

1. ÚVOD

S neustálým rozvojem stávajících vědních disciplín vzniká interdisciplinarita mezi jednotlivými obory výzkumu, což s sebou také nese vznik nových vědních disciplín na pomezí již stávajících. Zájem humanitních věd o nové úhly pohledu přivádí tyto vědy na křižovatku s vědami technickými či přírodovědnými. A jedná se o velmi zajímavé spojení. Například aplikace statistiky v egyptologii, či geofyziky při přípravě terénních archeologických výzkumů, nebo čím dál užší spolupráce archeologů s chemiky. Na bázi této spolupráce se objevila nová disciplína – analýza organických reziduí.

Předkládaná práce se pokouší o formulaci tohoto vědního oboru a jeho podstaty a snaží se čtenáře uvést do problematiky analýzy organických reziduí a na praktických vzorcích ukázat jedno z možných analytických řešení.

V teoretické části práce je čtenáři v první kapitole představena základní terminologie a s tím související informace. Vymezení pojmů archeologická keramika a rezidua. Stručné představení prací, které vedly ke vzniku samostatné vědní disciplíny a jejích základních myšlenek. V další kapitole se práce zabývá již faktory, jež ovlivňují zachovávání těchto reziduí a tím, jak zamezit kontaminaci či zničení informací uchovaných v reziduích. Následuje stručný výčet látek, které je možné v reziduích analyzovat, z nichž nejpočetnější jsou lipidy. Těmi se poté tato práce zabývá dále. V poslední kapitole je na základě prostudování předchozích článků věnujících se analýzám lipidů a mastných kyselin navrhnutá metoda analýzy od odběru vzorku, přes jeho úpravu až po finální instrumentální analýzu.

V experimentální části, která byla zaměřena na analýzu mastných kyselin, byl podrobně popsán laboratorní postup této analýzy, jenž je doplněn i fotograficky.

Ve výsledcích práce pak čtenáři najdou přehledně zpracované chromatogramy s identifikovanými sloučeninami jednak v módu TIC a jednak také v módu charakteristických hmot cílových analytů. Výsledky všech analyzovaných vzorků jsou pak shrnuty v části Diskuze.

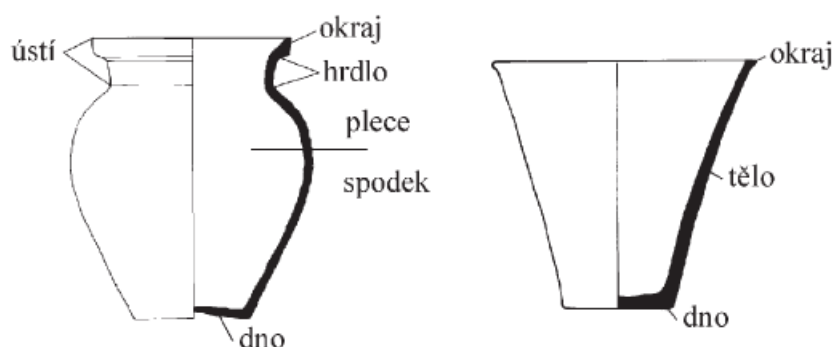
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Archeologie a rezidua

Archeologie jakožto věda zabývající se minulými lidskými společnostmi využívá ke svému studiu hmotné archeologické prameny [1]. Těmi mohou být jednak nemovité (terénní) pozůstatky (např. sídliště, pozůstatky domů, chrámů a jiných staveb, opevnění, příkopy, cesty, obětiště, sýpky, pece, odpadní jámy a jiné) a jednak movité (mobilní) památky dokládající lidskou řemeslnou činnost. K těmto, laikům poněkud známějším, hmotným památkám patří hlavně kovové předměty, jakými jsou šperky, zbraně, nádoby, různé řemeslné a zemědělské náčiní a nástroje, dále také nástroje a výrobky z kamene a jiných minerálů (jantar, vzácné kameny), výrobky z kostí a paroží, ozdoby z mušloviny. Těmi nejvýznamnějšími hmotnými památkami jsou však výrobky zhotovené z hlíny – keramické nádoby, neboť právě ty určují danou archeologickou kulturu. [2]

2.1.1 Keramické nádoby

V širším slova smyslu znamená keramika v archeologické terminologii veškeré výrobky z hlíny, ať už pálené či nikoliv. Do tohoto širšího kontextu tedy patří i sošky, amulety, stavební materiál. Tato forma keramických památek je známá již od mladšího paleolitu. V užším slova smyslu se pojmem keramika rozumí pouze hliněné nádoby, ty jsou známy od neolitu. Jelikož měly nádoby nižší životnost a byly nejdříve vyráběny podomácku, kdy jim ženy dodávaly kmenový, resp. etnický ráz, jsou jedním z nejcitlivějších pramenů k poznatkům technologického a stylistického vývoje. [2] V souvislosti s keramikou se setkáváme s pojmem střep. V širším slova smyslu se jedná o základní hmotu keramických výrobků, v užším smyslu o zlomek stěny nádoby (okraj, výduť/tělo, dno). [3] Jednotlivé části stěn nádob popisuje Obrázek 1.



Obrázek 1: Části nádob [5]

Již v dřívějších dobách se při amatérských archeologických výzkumech nalézaly keramické nádoby s viditelnými pozůstatky potravin či jinými uvnitř zachovanými komoditami, ovšem v této fázi (starožitnické/romantické) archeologie byly důležité zejména „poklady“, sbíraly se jen věci pěkné či nějak zajímavé. Nezřídka se stávalo, že obyčejné nádoby byly při vykopávkách ponechávány či odhazovány v okolí naleziště. V některých

případech byly dokonce i záměrně ničeny. Postupně s tím, jak se archeologie pomalu stávala samostatným vědním oborem, rostl i zájem o (zvláště keramické) nádoby a jejich spojování s jednotlivými kulturami. Celé nádoby, ale i jejich fragmenty byly vyzvedávány, studovány a posléze uchovávány a nakonec i vystavovány v muzeích. Při výzkumu nádob se v tomto období ale hledělo spíše na tvar, výzdobu a materiálové složení nádoby. Pokud se uvnitř nacházel nějaký viditelný zbytek po potravinách, tak byl ve většině případů vybrán ven a nádoba od něj byla pečlivě očištěna. [4] I když alespoň v určitých případech, pokud zde byla možnost rozeznat nějaký makrozbytek (např. obilný klíček, pecky a jádra plodů atd.), tak byla informace o něm zaznamenána [1]. S rozvojem archeobotaniky byly tyto zbytky stále pečlivěji zkoumány. Ovšem archeobotanika dokáže podat svědectví o složení stravy na základě nalezených makrozbytků, studuje rostlinné druhy, ze kterých tyto makrozbytky jsou [3], ale již se nezabývá chemickými analýzami reziduí, které jsou amorfní a popisem jejich „základních stavebních kamenů“. Problematikou těchto organických zbytků v archeologických nádobách se zabývá disciplína na pomezí archeologie a chemie označovaná zkratkou ORA – Organic residue analysis [6].

2.1.2 Rezidua

Pojmem reziduum (z latinského residuum) se obecně rozumí „zbytek“ či „zůstatek“ [7]. V archeologii se tento výraz používá pro organický zbytek zpravidla zachovaný v nádobách. Rozlišujeme 3 základní formy organických reziduí v archeologických nádobách [8]:

- původní *in situ* obsah – skutečná náplň, která se v ní zachovala od doby uložení do nádoby, přes pohřbení až po vyzvednutí ze země; tato forma reziduí je poměrně vzácná a setkáváme se s ní například v podobě obsahu egyptských kanop, kde nalézáme pozůstatky z měkkých tkání
- povrchové rezidua – jedná se o viditelné zbytky na vnějších i vnitřních stěnách nádob, jejichž původ je spojen s hořením. Na vnějších stěnách například saze (popř. i zbytky pryskyřic, které nám mohou napovědět více o užívaném dřevu k vytápění) [9], nebo u kahanů se může jednat o pozůstatky paliva, příp. knotu. Ojedinele se může jednat o zbytky výzdoby nádoby v podobě organických barviv. Na vnitřních stěnách pak nalézáme pozůstatky po „nehodách“ při vaření v podobě karbonizovaných zbytků potravy – příškvarcích [10]. V anglické literatuře označovaných jako „crusts“ [11]. Nevýhodou těchto povrchových reziduí je, že mohou být kontaminovány postdepozičními procesy při uložení nádoby v zemi.
- adsorbovaná rezidua – nejrozšířenější forma reziduí; jedná se o látky, které se při přípravě a skladování jídla či jiných komodit dostávají difúzí do pórů keramiky. Jsou tak relativně chráněná před vnějším prostředím, a tak se dochovávají ve velkém procentu nádob a střepů. Při studiích na rozsáhlém počtu keramických střepů bylo zjištěno, že ve více jak 80 % byla nalezena nějaká adsorbovaná rezidua. Při dalších studiích pouze zhruba 10 % artefaktů nedokázalo poskytnout žádná data. Při laboratorních pokusech, kdy byly v rekonstruovaných nádobách

vařeny v časových odstupech rozdílné suroviny, bylo zjištěno, že i když se do pórů keramiky naadsorbují biomolekuly z jedné suroviny, při vaření další suroviny dochází k adsorpci jejích biomolekul do volných pórů a biomolekuly charakteristické pro předchozí surovinu nejsou nijak poškozeny. Proto tato forma reziduí udává i informace o celkovém životu nádoby a jejím využití. Analýzy adsorbovaných reziduí mohou tedy poskytnout informace o tom, zda měly určité typy nádob konkrétní využití pro specifické potraviny, či to byly nádoby univerzální. [8], [12]

2.2 Analýza organických reziduí - Organic residue analysis (ORA)

Organic residue analysis (ORA), česky analýza organických reziduí, je interdisciplinární odvětví archeologie zabývající se analýzou a interpretací organických zbytků nacházejících se ve zkoumaných archeologických nádobách. ORA se zabývá hlavně analýzou základních stavebních kamenů – tzv. biomarkerů, ze kterých je složena lidská potrava, ale i jiné komodity organického původu. Těmito základními kameny jsou myšleny zejména lipidy (analýzy lipidů jsou v tomto oboru nejpočetnější), proteiny, sacharidy a nukleotidy. [6]

2.2.1 Vznik, historie, současnost

Ačkoliv se může zdát, že jde o mladou a poměrně moderně pojatou disciplínu (zvláště přístrojovou vybaveností), své počátky má již v roce 1976, kdy byla provedena první analýza adsorbovaných reziduí z neglazovaných keramických nádob pomocí plynové chromatografie, kterou provedl Thomas Condamin a kol. [8]. Dalším významným milníkem byl rok 1985, kdy byly pro potřeby archeologie provedeny první analýzy stabilních izotopů, které se nyní v analýzách potravinových reziduí hojně využívají (nejčastější metoda hned po kombinaci plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)) [13]. Od devadesátých let 20. století byly chemické analýzy keramických nádob využívány pro další poznávání archeologických období a kultur stále častěji, což ve velké míře jistě souvisí s rozšířením instrumentální techniky, zejména již zmiňované GC/MS, která se postupně stala běžným vybavením většiny chemických analytických pracovišť. Průkopníkem této vědní disciplíny byl (a stále je) profesor Richard Evershed z University of Bristol, UK, který se ve své profesní kariéře zabývá chemickými analýzami v archeologii, biogeochemii, biomolekulární paleontologii a rekonstrukci paleoklimatu a paleoprostředí. Publikoval více než 300 studií, v nichž se těmito tématům věnuje zejména na základě analýz organických reziduí (ať už z keramiky, kostí, půdy či jiného archeologického materiálu). Byl jedním z prvních vědců, kteří začali běžně používat plynovou chromatografii (GC), plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC/MS), analýzu stabilních izotopů (GC-C-IRMS) a kapalinovou chromatografii (HPLC) pro studium organických látek (zejména pak lipidů) v archeologických materiálech. Od této doby všechny výše zmíněné techniky zažívají „boom“ v ORA analýzách, jsou publikovány tisíce takových studií a profesor Evershed je také ve většině z nich citován. Další významná jména z této vědní disciplíny jsou například Mark

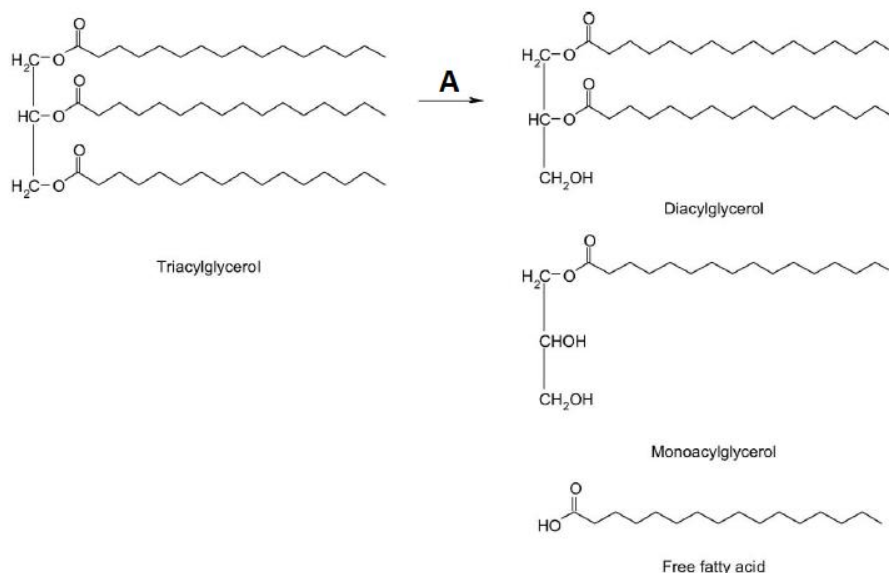
S. Copley, Sven Isaksson, Oliver E. Craig, A. J. Mukherjee a další. Z českého prostředí se problematice organických reziduí zabývají Mgr. Ing. Lubomír Prokeš, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity a tým kolem Mgr. Jaroslava Pavelky, Ph.D. a PhDr. Ladislava Šmejdy, Ph.D. ze Západočeské univerzity v Plzni, kteří aplikují zejména imunochemické testování na detekci původu organických reziduí v archeologických keramických nádobách.

2.2.2 Koncepce

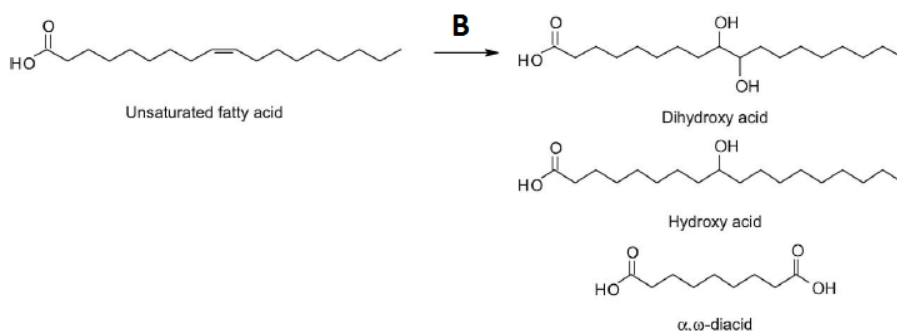
Během vývoje této vědní disciplíny byla položena základní koncepce nesoucí následující (výzkumem již potvrzené) myšlenky [8]:

- *Biomolekuly identifikované při analýzách nemusejí být těmi původními obsaženými v připravované potravě.* Velká část sloučenin jsou produkty degradačních procesů (oxidace, mikrobiální rozklad atd.) ať už proběhnutých během přípravy jídla, či během postdepozičních procesů po vyhození nádoby a jejím uložení v zemi. Např.: Obrázek 2 znázorňuje hydrolytickou degradaci (reakce A) triacylglycerolů produkující jejich mono- a di- substituované acyl-deriváty. Při zahřátí triacylglycerolů nad 280 °C dochází k jejich totální hydrolýze na glycerol a volné mastné kyseliny.

Obrázek 3 znázorňuje oxidaci dvojné vazby MK (reakce B) a tvorbu a vznik dihydroxykyselin, které jsou současně prekurzory jejich dodatečné oxidace na dikarboxylové kyseliny s kratším uhlíkovým řetězcem.



Obrázek 2: Příklad degradačních procesů, při kterých vznikají základní biomarkery organických reziduí.
Reakce představuje degradaci triacylglycerolu. Reakce B zachycuje oxidaci dvojné vazby. [8]



Obrázek 3: Příklad degradačních procesů, při kterých vznikají základní biomarkery organických reziduí.
Reakce zachycuje oxidaci dvojně vazby. [8]

- *Nutná znalost i paleoenvironmentu a archeologických souvislostí.* Jedině tak mohou být eliminovány zavádějící výsledky analýz. Byla provedena studie, kdy byl stejný vzorek rezidua odeslán do různých laboratoří bez udání lokace nálezů (Levanta). Ani jedna z analýz neposkytla užitečné informace, přestože se skladbou sloučenin k identifikaci velbloudího mléka velmi blížili.
- *Kvantifikace pomocí interních standardů dokáže poskytnout cenné informace,* přestože je dosud velmi málo prováděna. Na základě koncentrace adsorbovaných reziduí dokáže například sdělit informace o způsobu akumulace lipidů v nádobách během užívání, životnost nádoby a její postdepoziční historii, ale také informaci o ekonomických aktivitách. Pro to je však potřeba většího počtu systematicky vybraných vzorků.

2.3 Faktory ovlivňující stav a zachování organických reziduí

Svou roli při možnostech analýzy základních stavebních jednotek rostlinných a živočišných látek z organických reziduí uvnitř nádob hraje především samotná nádoba (její materiálové složení), stáří nádoby a s tím související zchovalost, resp. degradace organických sloučenin a také prostředí, ve kterém se nádoby před analýzou nacházely [6].

2.3.1 Nádoba

Pro možnost analýzy reziduí hraje právě nádoba velkou roli, neboť určuje, jestli a v jaké míře a formě se zde organické reziduum zachová. V podstatě můžeme rozlišit dva typy nádob, které pak udávají i formu rezidua:

2.3.1.1 Nekeramické nádoby

Do této kategorie spadají všechny nádoby, určené pro uchovávání a přípravu potravin a jiných organických surovin, vyrobené z jiného materiálu, než keramické hmoty. Můžeme

sem zařadit tedy nádoby vyrobené z kamene, bronzu, cínu a jiných kovů, či nádoby vyrobené z minerálů – např. mramoru, anhydritu apod.

Kamenné a minerální nádoby využívaly pro uchovávání surovin zejména starověké národy. Kamenné nádoby jsou typické například pro starověký Egypt, kde se využívaly pro uchovávání kosmetických surovin královen a ostatní nobility, nebo také na výrobu kanop (zejména z vápence a v období Staré říše), které sloužily k uchovávání mumifikovaných orgánů zemřelého. Kamenné nádoby se zde však využívaly i k mnoha dalším účelům [14], [15].

Bronzové nádoby jsou poté typické pro evropský pravěk – přesněji dobu bronzovou, kde se využívaly pro přípravu jídla například v podobě kotlíků, věder, amfor, naběraček, šálků, misek apod. [2]

Co mají však všechny tyto nekeramické nádoby společného je to, že pro své materiálové složení nemají žádné póry, kam by se organická rezidua mohla naadsorbovat. V tomto druhu nádob můžeme nalézt jen dvě formy reziduí a to buď původní náplň, nebo na první pohled viditelný organický zbytek uchovaný uvnitř nádoby, případně na stěnách nádoby. Může se jednat jak o původní časem degradovaný pozůstatek suroviny či v případě tepelného upravování o „příškvarek“ uvnitř nádoby [16].

2.3.1.2 Keramické nádoby

Z výše uvedeného textu vyplývá, že v keramických nádobách se můžeme setkat se všemi formami organických reziduí. Keramické nádoby mají však oproti nekeramickým nádobám tu výhodu, že dokáží adsorbovat relativně velké množství a velkou specifitu sloučenin. Míra adsorpce závisí na velikosti a tvaru daných pórů v keramice. Velikost a tvar pórů zase závisejí na kvalitě úpravy povrchu keramiky a podmínkách výpalu při výrobě nádoby [18]. Některé studie dokonce prokázaly jistou míru adsorbovaných reziduí i v novověkých glazovaných keramických nádobách [17].

2.3.2 Prostředí

Jelikož velkou část archeologických nádob nacházíme při terénním výzkumu archeologických situací pod zemí, hraje právě půda velkou roli při tom, jestli se daná rezidua dochovají, či nikoliv. Při volbě možných vzorků na testování je proto vhodné znát podmínky vyzvednutí dané nádoby či jejího fragmentu. Během doby, po kterou byly nádoby uloženy pod zemí, mohlo totiž dojít k různým dekompozičním procesům. Zejména k mikrobiálním rozkladným procesům, dále u lipidů například k pyrolýze a autooxidaci. Nejčastějšími půdními faktory, které ovlivňují zachování reziduí, jsou pH, teplota, expozice světlem, stupeň podmaččení a oxidačně-redukční podmínky. V jistých případech byly zaznamenány i případy vysokého stupně zachování reziduí v extrémně vysušených anebo naopak extrémně podmačených půdách. [18]

Dalším vnějším faktorem, který může ovlivnit stav reziduí, je kontaminace. K ní může zpravidla dojít hned při vyzvednutí vzorku při kontaktu nechráněných lidských rukou s povrchem vzorku. Pokud se již dopředu ví, že daný vzorek půjde na analýzu organických látek, je vhodné použít ochranné rukavice a eliminovat tak případné zkreslení výsledku. Na povrchu lidských rukou se totiž nachází některé látky, které lze nevhodnou manipulací se vzorkem zaměnit za složky živočišných tuků dříve uchovaných v dané nádobě – jedná se například o cholesterol a skvalen. Cholesterol se dokáže zachovat po dlouhá archeologická období. Přestože není obvyklé identifikovat jeho velké množství v archeologických nálezech, špatnou manipulací se vzorky dochází k jeho enormnímu navýšení. Skvalen naproti tomu degraduje poměrně rychle, proto ho můžeme z výsledků analýz vyloučit a jeho identifikace ve vzorku poukazuje čistě na špatné zacházení se vzorkem a s tím související kontaminaci z lidských rukou. [18]

2.3.3 Manipulace po vyzvednutí

Pak ale také závisí na podmínkách, ve kterých je nádoba či její fragment uchován po nalezení a vyzvednutí z terénu, a díky kterým může být opět zkreslen výsledek analýz či se žádné reziduum nemusí vůbec dochovat. Tato skutečnost nastává nejčastěji v případě, že je nádoba či její fragment ošetřen (konzervován) chemickými látkami. Vůbec nejnižší možnost izolace biomolekul nastává v případě dlouhodobého uchování nádoby v muzeu či depozitáři, neboť zde nejsou příliš příznivé podmínky, ale hlavně také proto, že se dříve ke konzervaci používaly velmi drastické chemické látky, které jakékoliv organické zbytky dokonale zničily. Dále může výsledky analýz zkreslit uchovávání nádob v dřevěných šuplicích (riziko kontaminace vzorku terpenoidy) či plastických sáčkích a boxech (kontaminace ftaláty). Z těchto důvodů se jako nevhodnější materiál k uchovávání vzorků keramických nádob určených pro analýzu na organické látky jeví papírové sáčky, které jsou naštěstí také ve většině případů používány při vyzvedávání archeologických nálezů z terénu a pro jejich následné uchování. [18]

2.4 Biomolekuly identifikovatelné v reziduích

V archeologických reziduích je v podstatě možné identifikovat všechny důležité organické biomolekuly tvořící základní stavební kameny živých organismů. Jedná se tedy o nukleotidy, proteiny, sacharidy a lipidy. Stabilita stanovených analytů je determinována jejich fyzikální, chemickou a biologickou odolností. Nejlepších stabilitních parametrů dosahují lipidy, neboť se jedná o hydrofobní látky, s klesající pravděpodobností je následují sacharidy, dále proteiny a s nejnižší pravděpodobností zachování v archeologických vzorcích nukleotidy. Současný stav výzkumu se zaměřuje především na identifikaci lipidů a proteinů, jelikož umožňují detailnější rekonstrukci obsahu dané nádoby a také z důvodu jejich vyšší persistence ve vzorcích. [18], [20]

2.4.1 Lipidy

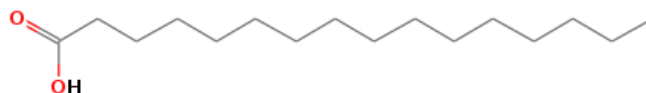
Lipidy jsou přírodní nepolární sloučeniny téměř nebo zcela nerozpustné ve vodě, které lze izolovat z rostlinných a živočišných buněk extrakcí nepolárními organickými rozpouštědly. Nejrozšířenějšími lipidy jsou rostlinné oleje a živočišné tuky. V obou případech se jedná o triacylglyceroly vyšších mastných kyselin (TAG). V rostlinných olejích převažují nenasycené mastné kyseliny, kdežto v živočišných tucích nasycené mastné kyseliny. Dále mezi lipidy patří mnohé vitaminy a hormony, vosky, terpeny a většina nebílkovinových složek buněčných membrán. [20]

Při identifikaci složek organických reziduí se nejčastěji setkáváme s triacylglyceroly (TAG), fosfolipidy a steroly. V případě jednotlivých sloučenin se jedná především o mastné kyseliny – zejména kyselinu palmitovou a stearovou, které jsou ale všudypřítomné a tudíž nejsou diagnostické. [18] Diagnostickými se mohou stát v případě, kdy je po izolaci a identifikaci z reziduí podrobíme analýze stabilních izotopů uhlíku, kdy dokážeme rozlišit, jestli dané kyseliny pochází z tuků přežvýkavců či nepřežvýkavců (rozdílná strava a rozdělení jednotlivých izotopů uhlíku), popř. mléčných tuků [19].

Rozlišujeme nasycené (obsahují ve svých molekulách pouze jednoduché vazby) a nenasycené (obsahují jednu a více dvojných vazeb) mastné kyseliny.

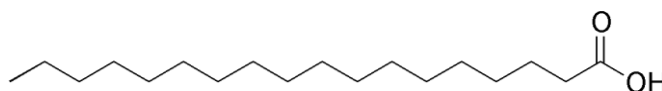
Nejčastěji nalézané mastné kyseliny při analýze organických reziduí:

- *kyselina palmitová* C16:0¹ – nachází se téměř ve všech potravinách – mase, másle, mléce, rostlinných olejích, obilovinách, luštěninách atd. [21]



Obrázek 4: Kyselina palmitová [21]

- *kyselina stearová* C18:0 – stejně jako kyselina palmitová je všudypřítomná [22], proto nám při analýzách může podat informace pouze v kombinaci s ostatními sloučeninami a jejich poměrech ve vzorku



Obrázek 5: Kyselina stearová [22]

- *kyselina myristová* C14:0 - třetí nejvíce zastoupená kyselina v běžných potravinách [23]
- *kyselina olejová* C18:1 – nachází se například v pšenici, ječmenu, prosu, ale také v olivovém, hroznovém a makovém oleji [24]

¹ Označení mastných kyselin podle počtu uhlíků v řetězci a podle počtu dvojných vazeb. Číslo před dvojtečkou vyjadřuje počet uhlíků a číslo za dvojtečkou počet dvojných vazeb.

2.4.2 Proteiny

Proteiny jsou velké biomolekuly složené z α -aminokyselin, které jsou vzájemně spojeny amidovými (peptidovými) vazbami. Aminokyselinové řetězce spojeny z méně než 50 aminokyselin (AK) se nazývají peptidy, pro řetězce obsahující více než 50 aminokyselin se používá termín bílkoviny (proteiny). [20] V bílkovinách se běžně vyskytuje dvacet aminokyselin. Nejvýznamnějšími proteiny pro analýzu organických reziduí pomocí imunochemických metod jsou gluten a kasein. Dále jsou významné analýzy na imunoglobuliny (Ig), nazývané také jako protilátky. Jedná se o glykoproteiny krevního séra a nejčastějšími identifikovanými imunoglobuliny jsou β -laktoglobulin skotu a kozí imunoglobulin. [26], [27]

2.4.3 Ostatní

Mezi další často identifikovaná rezidua patří rostlinné vosky a pryskyřice zastoupené hlavně terpeny a deriváty kyseliny abietové. Tato rezidua se nejčastěji stanovují také pomocí GC/MS. Dále lze stanovovat například aDNA, rezidua po kakau či víně (zde je charakteristickým biomarkerem kyselina tartarová). [20]

2.5 Detekce organických reziduí pomocí analytických metod

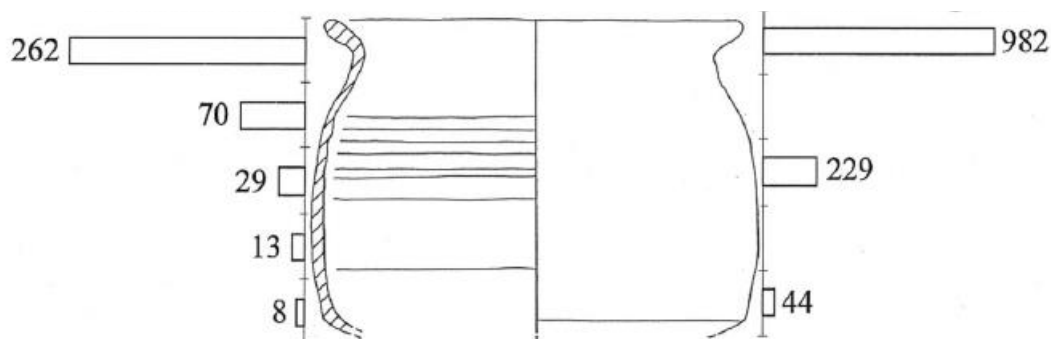
V současné problematice identifikace organických látek v reziduích jsou nejpobulárnější analýzy pomocí testů ELISA a analýzy pomocí plynové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) kombinované stále častěji také s analýzou stabilních izotopů (IRMS). V zásadě se jedná o velmi rozdílnou metodologii identifikace, neboť ELISA testy jsou určené pro analýzu proteinů a jedná se o metodu biochemickou, kdy k identifikaci dochází pomocí biochemické reakce. Tato metoda je výhodná z hlediska jednoduchosti, kdy nám k analýze stačí pouze testovací sada (kit) a analýzu tak může provést i laik v oblasti chemie. S tím souvisí i to, že na rozdíl od jiných metod k této analýze nepotřebujeme žádné přístroje a jedná se tedy o metodu relativně levnou a lehce proveditelnou. Naproti těmto analýzám stojí metody instrumentální, které vyžadují poměrně složitou přístrojovou vybavenost a také odbornost personálu. Tyto metody jsou dražší, časově náročnější a přístrojově rozmanitější. [16], [17], [18], [29],[34].

Nejčastějšími přístroji pro tyto analýzy jsou plynový chromatograf, použit buď samostatně (GC), nebo v kombinaci s hmotnostním spektrometrem (GC/MS). Dále je také velmi často používána technika pro analýzu poměru stabilních izotopů – IRMS (*Isotope ratio mass spectrometry*). Méně častými pak například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), nukleární magnetická rezonance (NMR) a infračervená spektroskopie (FTIR), neboť NMR ani FTIR nedokáží podat tak detailní informace o struktuře biomolekul jako první tři výše zmíněné techniky [20] Při detekci závisí také na tom, v jaké formě se reziduum dochová – zda-li ve formě příškvaru či jako zbytek potravy na povrchu nádoby, nebo zda se snažíme detekovat adsorbovaná rezidua v pórech keramických nádob. Testovací kity určené pro imunochemické testování přítomnosti proteinů lze využít hlavně na povrchová viditelná

rezidua, ovšem je možné skalpelem seškrábnout i část keramického prášku ze stěny nádoby za účelem identifikace bílkovin v pórech keramiky [30]. Naproti tomu pokud chceme analyzovat širší škálu analytů v pórech keramiky, je vhodné použít instrumentální techniky v podobě GC/MS či IRMS. Ovšem nutným předstupněm těchto technik je extrakce, kdy se vhodnými extrakčními činidly a extrakční technikou snažíme o co nejlepší izolaci organických reziduí z keramické matrice. Pro identifikaci mastných kyselin pomocí GC/MS, na kterou se soustřeďuje experimentální část této práce, je pak nutné přistoupit k derivatizaci – úpravě MK na lépe stanovitelné deriváty – například methylestery či trimethylsilyl deriváty.

2.5.1 Výběr a odebrání vzorku a jeho homogenizace

Pro co nejlepší výsledky analýzy je v první řadě nutné hlavně zvolit vhodné vzorky pro analýzu. Pokud se nám jedná například o obecnou analýzu rekonstrukce stravy obyvatel na konkrétní lokalitě či sídlišti, měly by vzorky být zvoleny z různých objektů a nálezových situací, aby dokázaly reprezentativně zastoupit danou lokalitu či sídliště. Pokud se snažíme rekonstruovat funkci pouze jedné nádoby, měli bychom správně zvolit, který z jejích fragmentů bude pro co nejlepší výsledky analýzy nejvhodnější. To znamená vybrat fragment, kde docházelo nejvíce ke styku organického obsahu nádoby s povrchem nádoby. Takže například při analýze nádob, které sloužily k vaření, je vhodné vybrat okraj nádoby, kde jsou působením Archimedova zákona lipidy nejvíce koncentrovány. Pokud nám naopak jde o analýzu zásobních nádob nebo například lamp atd., je vhodnějším keramickým fragmentem spíše dno, popř. stěna nádoby než okraj.



Obrázek 6: Koncentrace lipidů v μg na gram střepu v různých částech nádoby při experimentálním vaření (vlevo) a při extrakci z archeologické nádoby (vpravo)

Co se týče odebrání vzorku pro analýzu, tak opět záleží na typu analyzovaného rezidua. V případě povrchového rezidua (krusty, příškvarku) stačí potřebné množství čistým skalpelem či špachtličkou jednoduše seškrábnutím navzorkovat. Pro analýzu adsorbovaných reziduí musíme odebrat část keramického fragmentu – zase platí odebrání v místě, kde docházelo k nejpravděpodobnějšímu kontaktu s organickou látkou, a proto se vzorek odebírá spíše z vnitřní stěny nádoby. Odběr probíhá buď malým vrtákem nebo pomocí třecí misky s tloučkem, popř. v hmoždíři, kdy se snažíme keramický střep rozdělit na více fragmentů a některé z nich následně rozdrcením homogenizovat. Výsledkem by ve všech

případech měl být keramický prášek obsahující i případná organická rezidua. Ojediněle se dříve extrahovaly rezidua i z celých střepů, či nádob, ale tento způsob byl značně nevýhodný – jak z hlediska spotřeby rozpouštědla a časové náročnosti, tak i z hlediska nevelkých výtěžků vzhledem ke spotřebě rozpouštědla [35][36]. V současné době se proto dává přednost spíše extrakci z nadrceného/namletého keramického prášku. [6][11]

2.5.2 Extrakce

Extrakce je separační metoda, která se využívá k rozdělování a zakoncentrování cílových látek od matrice vzorku. Použitím extrakčního činidla jsou analyty odděleny od matrice dle rozdílné afinity chemických sloučenin ve vzorku ve prospěch fáze s vyšší afinitou k analytu. Dle zvoleného typu extrakčního média je možné rozdělit extrakce na rozdělovací (např. tuhý/kapalný vzorek a kapalné rozpouštědlo) nebo adsorpční (kapalný/plynný vzorek a tuhá fáze s chemicky aktivním povrchem). [37]

V případě analýz organických reziduí z archeologického materiálu je extrakce nejdůležitějším krokem v těchto analýzách, neboť správně zvolený způsob extrakce nám dokáže poskytnout dostatečný objem analytu pro následné instrumentální analýzy. Naopak špatně zvolená technika extrakce nám nemusí dát analyt vůbec žádný, a to i v případě že se ve vzorku analyty nachází. Jako příklad lze uvést studii, kdy byly analyzovány velmi staré vzorky o velmi malém množství. Jednalo se o vůbec jedny z nejstarších archeologických nálezů keramiky vytvořené moderním člověkem, datovaných do období zhruba 13 900 – 13 300 BP (before present - „před současností“) náležících kultuře Jomon v Japonsku. V této studii byly provedeny dva způsoby extrakce, přičemž první způsob – konvenční ultrazvuková lázeň za použití směsi rozpouštědel chloroformu (CHCl_3) a methanolu (CH_3OH) v poměru 2:1 (obj.) neposkytla žádné měřitelné analyty. A naopak druhý způsob – extrakce a transesterifikace methanolem s přidáním kyseliny sírové (H_2SO_4) jako katalyzátoru a následném povaření (4h, 70°C), poté přidání n-hexanu, protřepání a oddělení fází (methanolová fáze a fáze s methylovanými mastnými kyselinami) pomocí centrifugace (5 min) – přinesl uspokojivé množství lipidového extraktu pro možnost jeho analýzy pomocí GC/MS (a následně IRMS). [29]

Kromě dvou výše zmíněných způsobů extrakce existuje celá řada kombinací jak rozpouštědel, tak extrakčních technik, které lze na analýzy organických reziduí využít. Často také dochází ke kombinaci dvou technik aplikovaných kontinuálně po sobě, případně opakovaná extrakce pro zajištění co možná nejúčinnější extrakce. Obecně totiž platí, že opakovaná extrakce několika menšími dávkami rozpouštědla je účinnější než jediná extrakce celým množstvím rozpouštědla. [37]

Kalužna-Czaplińska porovnála téměř stovku studií zabývajících se analýzou organických reziduí v archeologických keramických nádobách pomocí GC-MS a ve své studii shrnula nejčastější metody extrakce (a také derivatizace, příp. i saponifikace). Ve většině případů se jednalo o extrakci ultrazvukem s pomocí rozpouštědla dichlormethanu nebo trichlormethanu a methylaci pomocí NaOH či KOH v methanolu, nebo trimethylsilylaci pomocí BSTFA. [13]

2.5.3 GC/MS

Analytická technika hmotnostní spektrometrie v kombinaci s plynovou chromatografií (GC/MS) je v poslední době vůbec nejpoužívanější technikou pro analýzu organických reziduí z archeologických keramických nádob. Setkáváme se s ní ve většině studií z posledních let z tohoto oboru. [8],[9],[12], [13], [16], [17], [19], [20], [28], [29], [34]. Ačkoliv se jedná o destruktivní techniku – vzorek je při analýze nenávratně zničen – autory studií je tato technika velmi vyhledávaná a to zejména díky vysoké citlivosti a selektivnosti. Díky kombinaci plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie lze nejprve pomocí plynové chromatografie oddělit jednotlivé složky ve směsi a následně pomocí hmotnostního spektrometru analyzovat na základě fragmentace analytu a výsledných hmotnostních spekter každou sloučeninu směsi a zjistit tak nejen její molekulární hmotnost, ale i strukturu stanovované sloučeniny. [31] Největší výhodou této techniky pro použití v analýzách organických reziduí tkví v stanovení látek ve velmi nízkých koncentracích a je tedy možné analyzovat vzorky o velmi malých množstvích, někdy řádově i setinách gramů. Je proto možné analyzovat i velmi vzácné vzorky – ať už velmi staré, či raritní, neboť pro analýzu spotřebujeme jen nepatrné množství. Tato technika se v mnoha případech ukázala jako ideální pro zjištění původu těchto organických reziduí a potenciálního účelu studované nádoby a v řadě výzkumů se podařilo také částečně rekonstruovat stravu tehdejších uživatelů nádob. [25]

2.5.4 IRMS

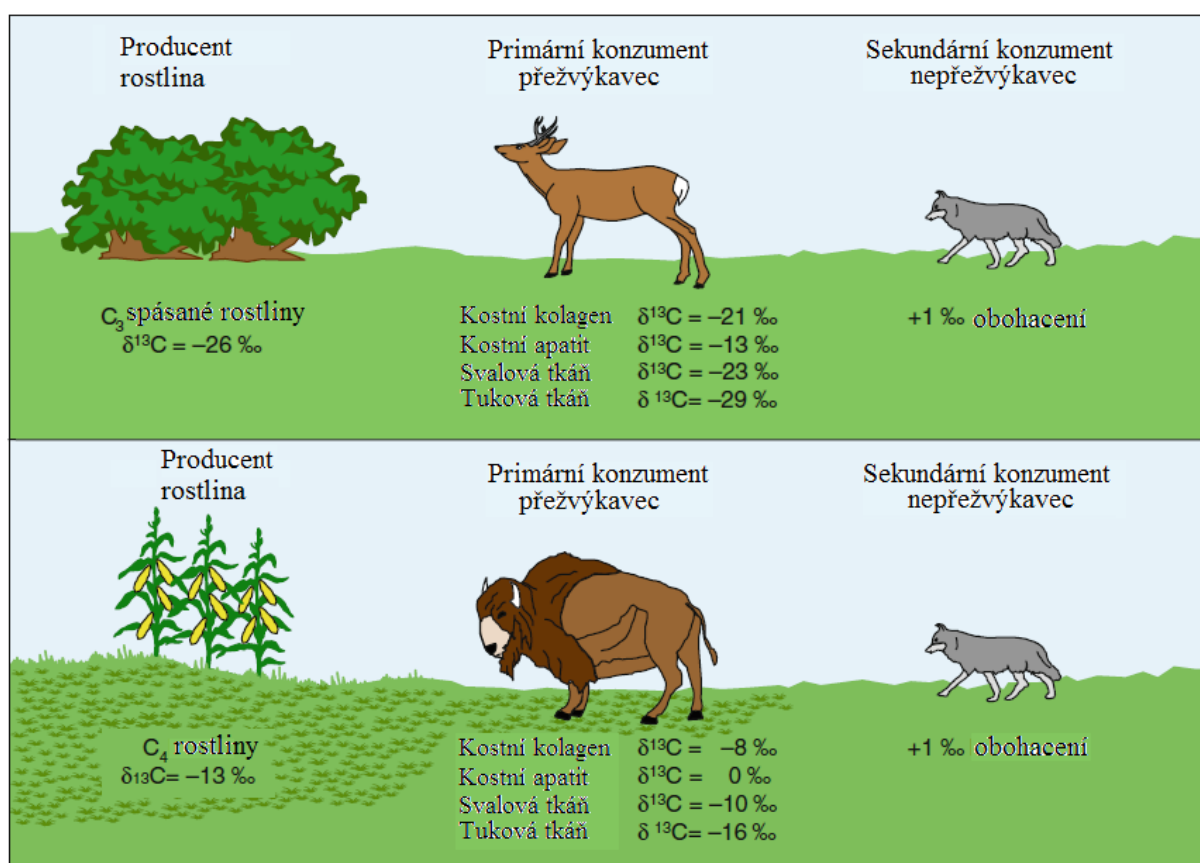
IRMS - Isotope ratio mass spectrometry – v češtině bohužel neexistuje doslovný překlad této techniky. Nicméně jedná se o techniku hmotnostní spektrometrie sloužící k určení poměru stabilních izotopů jednotlivých prvků ve vzorku. Stanovovanými prvky mohou být uhlík, dusík, kyslík, vodík nebo třeba také stroncium. V souvislosti s rekonstrukcí stravy minulých populací se nejčastěji využívá stanovování izotopů uhlíku a dusíku (například i při stanovování z kostního kolagenu lidských pozůstatků). [25]

U stanovování technikou IRMS se sleduje poměr dvou stabilních izotopů daného prvku, u uhlíku izotopy ^{12}C a ^{13}C , u dusíku ^{14}N a ^{15}N . Při analýzách lipidů a mastných kyselin nachází využití hlavně izotopy uhlíku, protože jejich struktura je tvořena dlouhými uhlíkovými řetězci. V praxi to vypadá tak, že se nejprve pomocí GC/MS separace stanoví mastné kyseliny a vybrané jsou dále podrobeny analýze na izotopy. Nejčastěji se vybírají kyseliny C16:0 (palmitová) a C18:0 (stearová) z důvodu jejich zastoupení v široké škále potravin. [25]

Poměr stabilních izotopů je vyjádřen jako $\delta^{13}\text{C}$ a vyjadřuje poměr izotopu ^{13}C ku ^{12}C ve vzorku, vztaženém k mezinárodnímu standardu Pee Dee Belemnite (vápencová mořská fosilie z Jižní Karoliny) uloženému ve Vídni:

$$\delta^{13}\text{C} = 1000 \cdot \left[\frac{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ vzorku}}{\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \text{ standardu}} - 1 \right] \quad (1)$$

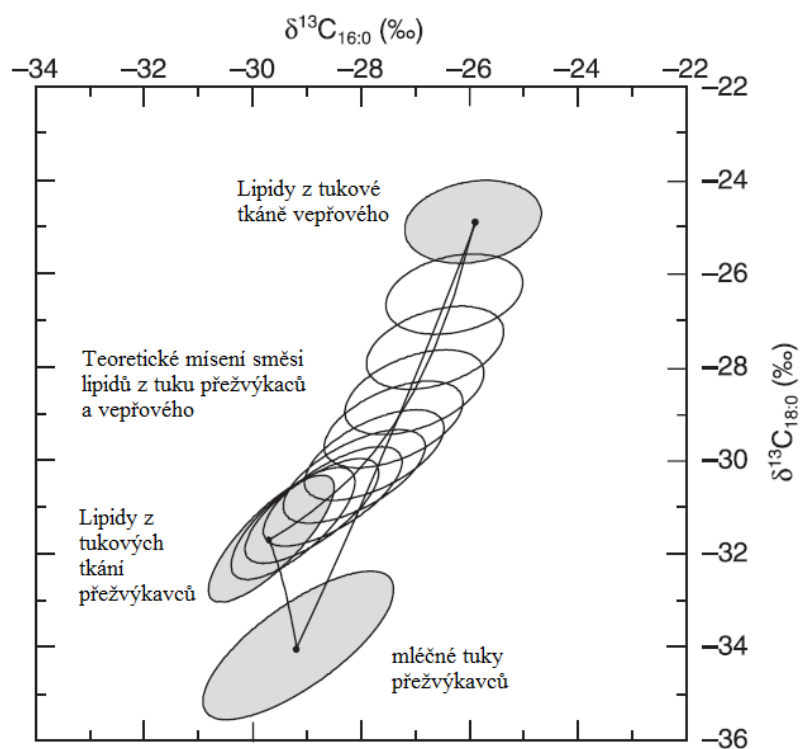
Standard obsahuje oproti většině přírodních materiálů méně izotopu ^{12}C a více izotopu ^{13}C . Z toho vyplývá, že hodnoty $\delta^{13}\text{C}$ vzorků jsou obvykle negativní. Rozdíly mezi vzorky jsou velmi malé, proto jsou hodnoty udávány v ‰ (promile) a obvykle se vyskytují v rozmezí -37‰ až -8‰ .



Obrázek 7: Průměrná izotopická frakcionace mezi rostlinami, tkáněmi přežvýkavců a nepřežvýkavci [25]

Poměr izotopů v analytu poskytuje informace o podmínkách, za kterých se vytvořil, neboť určité biochemické procesy upřednostňují jeden izotop (obvykle ten lehčí) oproti druhému, díky čemuž dochází k izotopové frakcionaci. To vede k měřitelným rozdílům mezi izotopickým složením výchozích reaktantů (např. potrava, kterou zvíře spotřebuje) a výsledných produktů (např. živočišné tkáně vytvořené z této potravy). Lze tedy zjistit, která kyselina palmitová pochází z rostlinného zdroje, která kyselina palmitová ze živočišného apod. [25] Následně například lze pomocí analýzy více střepů z jedné lokality zjistit poměr rostlinných olejů a masných a mléčných tuků ve stravě jejich obyvatel.

Na základě poměru poměrů stabilních izotopů uhlíků ve skeletech kyseliny palmitové (C16:0) a kyseliny stearové (C18:0) lze zjistit zdroj původních lipidů. Výsledný graf pak vypadá jako na obrázku níže, kdy souřadnice x a y udávají daný zdroj.



Obrázek 8: Graf znázorňující poměr mezi izotopickou frakcionací kyseliny palmitové a izotopickou frakcionací kyseliny stearové [12]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část práce zahrnovala analýzu 9 různých střeptů, různých velikostí, poréznosti, stáří a původu. Analýza byla zaměřena na identifikaci mastných kyselin. Na základě toho byla vybrána analytická metoda GC/MS, čemuž byly podmíněny i předchozí úpravy vzorku. Vzorky byly nejdříve homogenizovány na keramický prášek pomocí ruční vrtací brusky a v jednom případě pomocí oscilačního mlýna. Poté byly vzorky podrobeny ultrazvukové extrakci a centrifugaci. Jako extrakční činidlo byl použit dichlormethan. Před vlastní analýzou pomocí přístroje GC/MS od firmy Brüker byly vzorky derivatizovány dvěma způsoby. První způsob představoval metylaci katalyzovanou pomocí roztoku KOH v methanolu. Druhým způsobem byly z mastných kyselin pomocí derivatizačního činidla BSTFA vytvořeny jejich trimethylsilyláty. Celkově bylo tedy podrobena analýze 18 vzorků.

3.1 Seznam použitých chemikálií a plynů

- Hydroxid draselný, p.a. (Penta s.r.o),
- N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) s Trimethylchlorosilanem (TMCS) v poměru 99:1, 99% čistota pro GC derivatizaci (Sigma Aldrich, s.r.o, Německo),
- Dichlormethan, LiChrosolv[®] pro kapalinovou chromatografii, čistota $\geq 99,8\%$ (Sigma Aldrich, s.r.o, Německo),
- Isooktan, SupraSolv[®] pro GC (Supelco – Merck KGaA, Německo),
- Dusík 4.7 (Siad Czech spol. s.r.o., Česká republika).

3.2 Seznam použitých laboratorních pomůcek a přístrojů

- Ruční vrtací bruska (Proxxon, Německo),
- Mikropipety (100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l, 5 ml),
- Běžné laboratorní vybavení – plastová lžička, špachtlička, vialky, sušárna,
- Ultrazvuková lázeň TESON 4 ultrasonic washing (Tesla, Česká republika),
- Analytické váhy HR-120-EC (A&D Instruments, Japonsko),
- Koncentrátor EVATERM (Labicom s.r.o., ČR),
- Centrifuga EBA 20 (Hettich zentrifugen, Německo),
- Oscilační mlýn MM 200 (Retsch Verder s.r.o., Česká republika)
- Plynový chromatograf v kombinaci s hmotnostním spektrometrem Bruker EVOQ TQ (Bruker, s.r.o)

3.3 Vzorky

Tabulka 1: Analyzované vzorky

Vzorek č.	Název vzorku/lokality	Datace	odběr
1	Petrov_1	13.-14. stol.	exkavace (Baťův kanál, 2014)
2	Petrov_2	13.-14. stol.	exkavace (Baťův kanál, 2014)
3	Hrůdy_1	11.stol.	povrchový sběr (Sudoměřice)
4	Hrůdy_2	11.stol.	povrchový sběr (Sudoměřice)
5	Mikulčice_Valy	9.-10.stol.	exkavace (sídliště u VI. kostela)
6	Mikulčice_předhradí	9.stol.	exkavace (hradba, výzkum 2018)
7	Tell Lachish	1550-1200 př.n.l.	exkavace (Area S, výzkum 2017)
8	Ashkelon	2000-1550 př.n.l	povrchový sběr (canaanite city gate)
9	Pohansko	9.stol.	exkavace (SV předhradí, 2018)

3.4 Homogenizace

Homogenizace byla na prvních 8 střepech provedena pomocí ruční vrtací brusky, kdy byla obrušována keramická hmota z vnitřního povrchu střepu. Keramický prášek byl odebírán v množství o rozmezí 1-2 g. Poslední vzorek byl příliš malý na možné odebrání pomocí ruční vrtací brusky, a proto byl rozemlet pomocí oscilačního mlýna.



Obrázek 9: Odebírání vzorku pomocí ruční vrtací brusky



Obrázek 10: Mlecí kapsle se vzorkem a kuličkami z tvrzené oceli (součást oscilačního mlýna MM 200)



Obrázek 11: Oscilační mlýn MM 200 (Retsch Verder s.r.o., Česká republika)

3.5 Extrakce

Keramický prášek byl převeden do zkumavky, kde k němu bylo přidáno 5 ml extrakčního činidla v podobě dichlormethanu. Následně byla zkumavka upevněna do stojanu nad ultrazvukovou lázní TESON 4, která byla naplněna zhruba 3,5 litry vody těsně pod okraj. Zkumavka byla ponořena do vodní lázně tak, aby výška sloupce rozpouštědla ve zkumavce byla rovna s úrovní hladiny či pod její hladinou a zajistila se tak co nejvyšší účinnost ultrazvukových vln. Lázeň byla nastavena na 15 minut. Poté byla zkumavka přenesena do centrifugy a centrifugována po dobu 3 minut při 6000 ot/min. Čirá odstředěná fáze obsahující methylestery MK byla pomocí Pasteurovy pipety přenesena do vialky. K usazené keramické hmotě bylo opět přidáno 5 ml dichlormethanu a celý proces extrakce se opakoval stejným způsobem. Odstředěný extrakt s methylestery MK byl přidán k prvnímu extraktu a ponechán k odpaření pod dusíkem na koncentrátoru EVATERM. Po odpaření do sucha bylo ke koncentrovanému vzorku přidáno pomocí mikropipety 450 μ l isooktanu.



Obrázek 12: Extrakce v ultrazvukové lázni



Obrázek 13: Příprava vzorku k centrifugaci. Na protější pozici zkumavka s čistou vodou.



Obrázek 14: Odpařování vzorku do sucha na koncentrátoru EVATERM

3.6 Derivatizace

Z každého vzorku bylo odebráno do dvou vialek po 200 μ l MMK rozpuštěných v isooktanu. První část pro derivatizaci pomocí KOH v methanolu, druhá část pro derivatizaci pomocí BSTFA.

3.6.1 Methylace pomocí methanolického roztoku KOH

Ke 200 μ l vzorku ve 4 ml vialce bylo přidáno 200 μ l KOH v methanolu a 1 ml isooktanu. Vialka byla zašpuntována a po dobu 8 minut ručně třepána. Poté se nechala 5 minut stát, než došlo k oddělení vrstev. Horní vrstva s methylestery mastných kyselin byla pomocí Pasteurovy pipety odebrána do 2 ml vialky pro analýzu pomocí GC/MS.

3.6.2 BSTFA

Ve 2 ml vialce bylo 200 μ l vzorku odpařeno pod dusíkem na koncentrátoru EVATERM, poté k němu bylo přidáno 100 μ l derivatizačního činidla BSTFA a vialka dána na 1 hodinu do sušárny na 70 °C. Po vyjmutí ze sušárny byl vzorek opět odpařen pod dusíkem do sucha a přidáno 200 μ l hexanu. Jelikož se jednalo o velmi malá množství, musela vialka obsahovat insert, který umožnil dostatečnou výšku hladiny pro odběr jehlou při analýze na GC/MS.



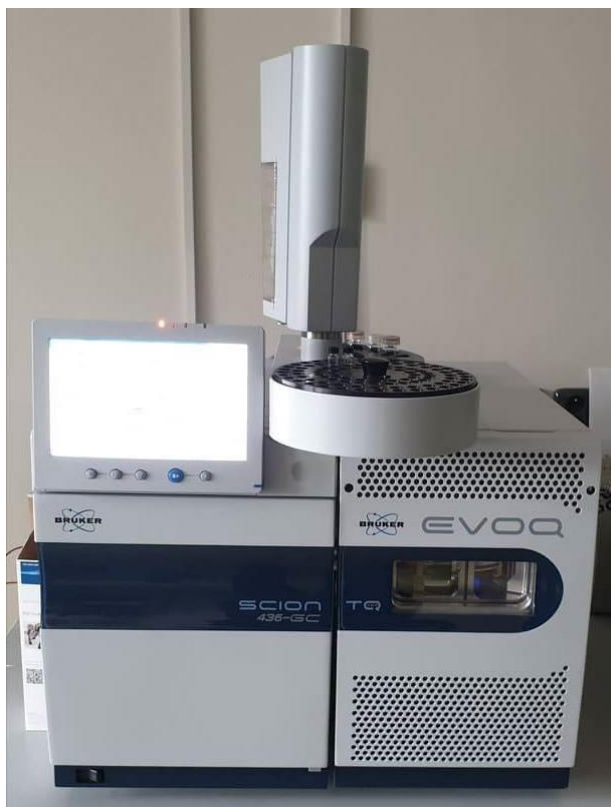
Obrázek 15: Odebírání horní vrstvy s vyextrahovanými methylestery MK



Obrázek 16: Vzorek Petrov_1 po derivatizaci KOH v MeOH (vlevo) a po derivatizaci BSTFA (vpravo) - použití insertu

3.7 Analýza na GC/MS

Identifikace derivátů mastných kyselin byla provedena na přístroji Brüker EVOQ disponujícím autosamplerm a trojitým kvadrupólem jako analyzátozem. Nosným plynem je zde hélium. Data byla vyhodnocena pomocí Brüker Daltonics MS Workstation verze 8.2.1 v módu TIC (Total Ion Chromatogram).



Obrázek 17: Brüker EVOQ GC-TQ MS

Total Ion Chromatogram poskytl komplexní informace o veškerých sloučeninách (tedy nejenom derivátů mastných kyselin) ve vzorcích, ovšem tím se podstatně snížila citlivost pro hledané deriváty MK v důsledku vysokých hodnot kontaminací vzorku. Proto byla data dále vyhodnocována manuálně porovnáváním jednotlivých píků vybraných charakteristických hmot se softwarovou knihovnou NIST, kterou Bruker EVOQ disponuje.

Pro vyhodnocování vzorků derivatizovaných pomocí KOH v MeOH byly vybrány hmoty 74 a 87, které jsou charakteristické pro methylestery mastných kyselin.

Pro vyhodnocování vzorků derivatizovaných pomocí BSTFA byly vybrány hmoty 73 a 75, které jsou charakteristické pro trimethylsilyl deriváty.

4. VÝSLEDKY

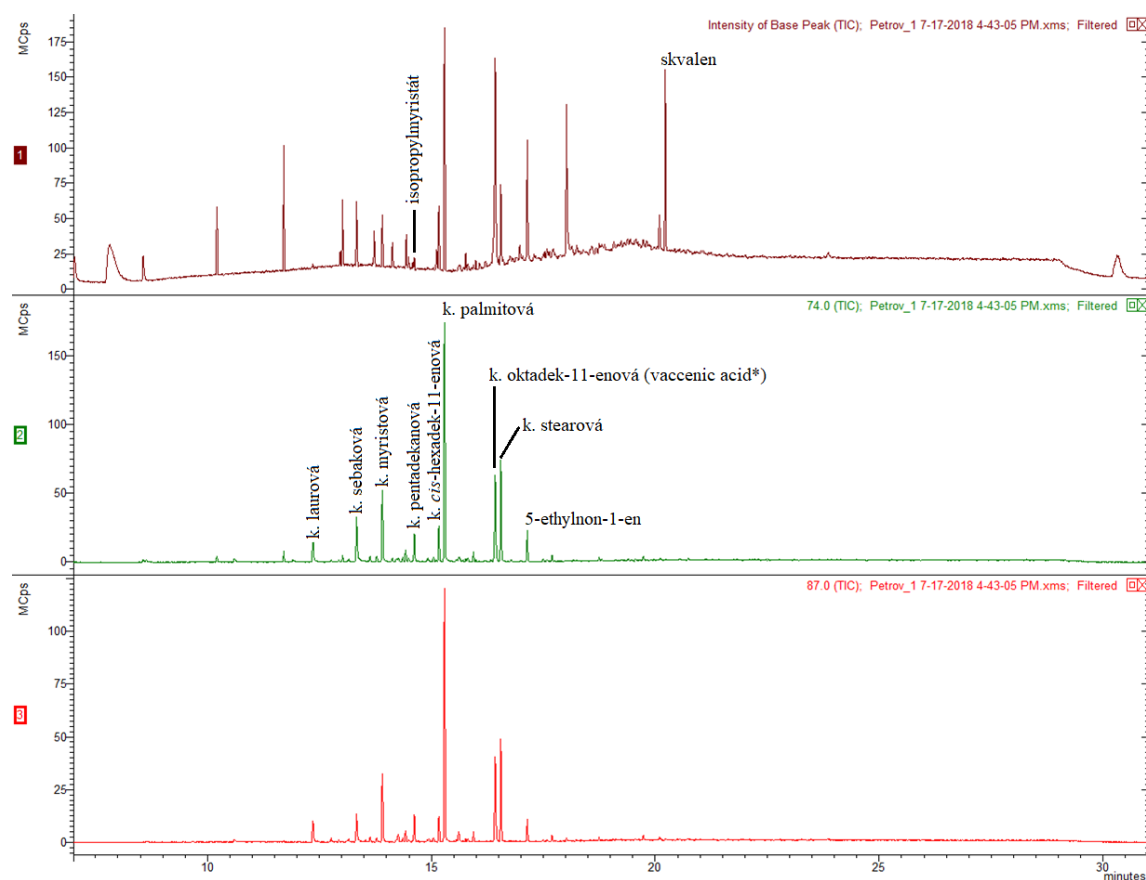
4.1 Vzorek č. 1 – Petrov_1

Velmi porézní keramický střep s viditelnými stopami po vaření na vnějším povrchu těla.



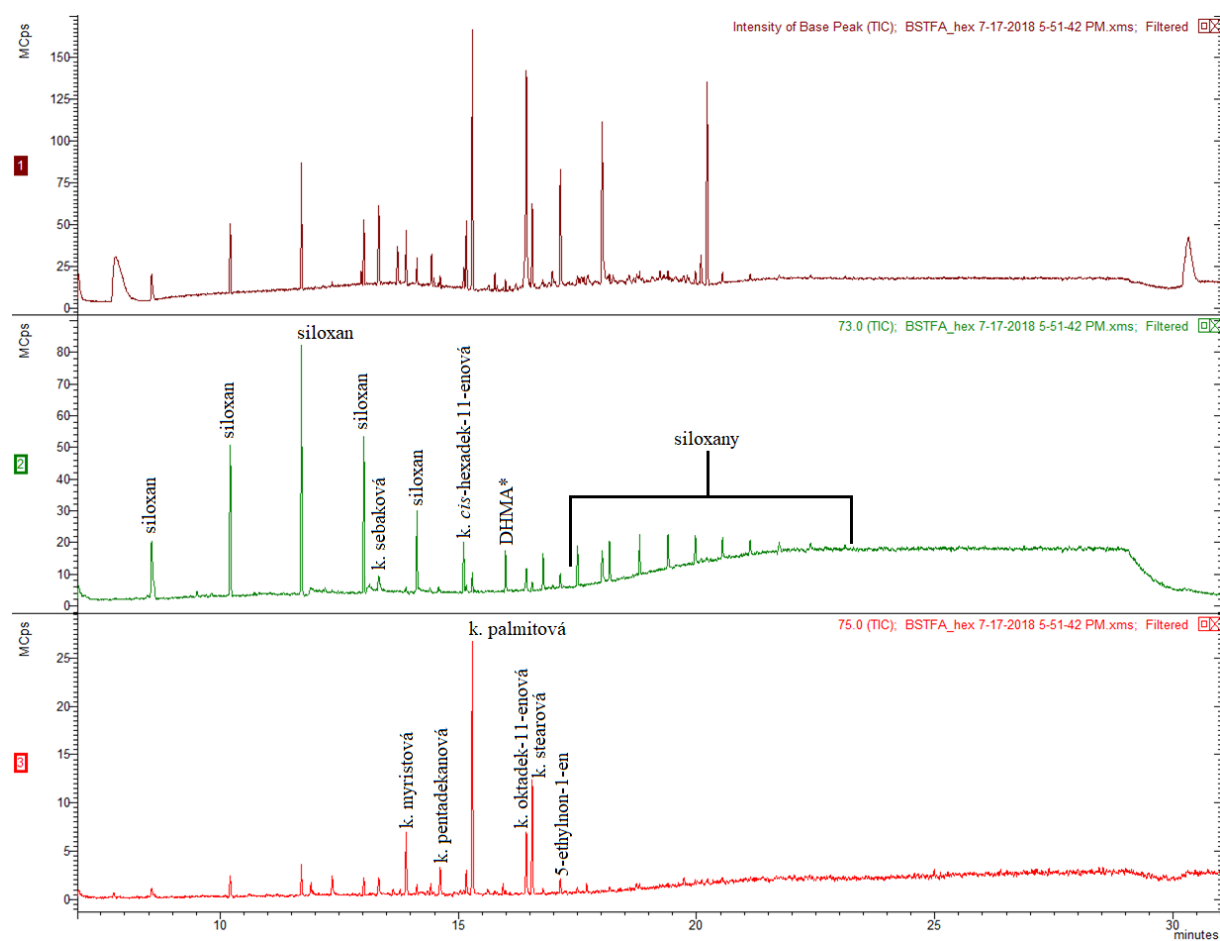
Obrázek 18: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.1.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 19: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Petrov_1 získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

4.1.2 Silylace pomocí BSTFA



Obrázek 20: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Petrov_1 získaných derivatizační metodou pomocí BSTFA

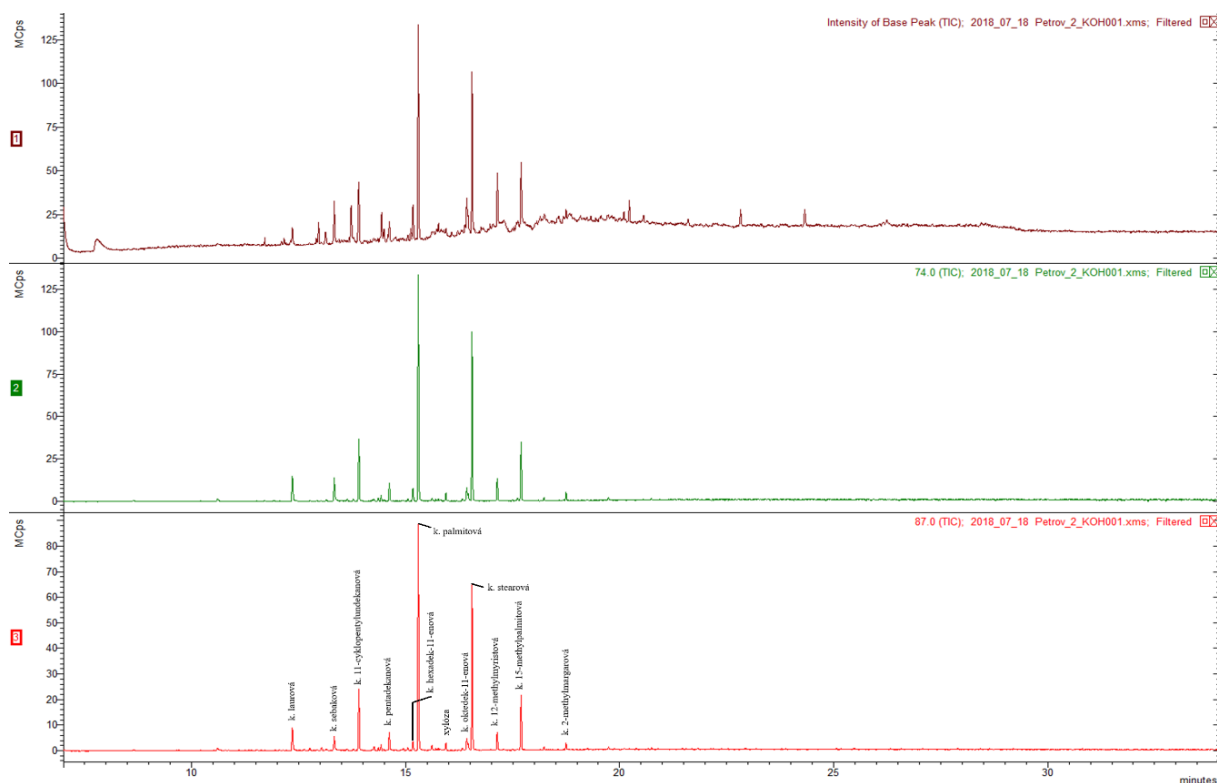
4.2 Vzorek č. 2 – Petrov_2

Okraj nádoby s viditelným zdobením, po obroušení viditelné větší póry ve stěnách nádoby.

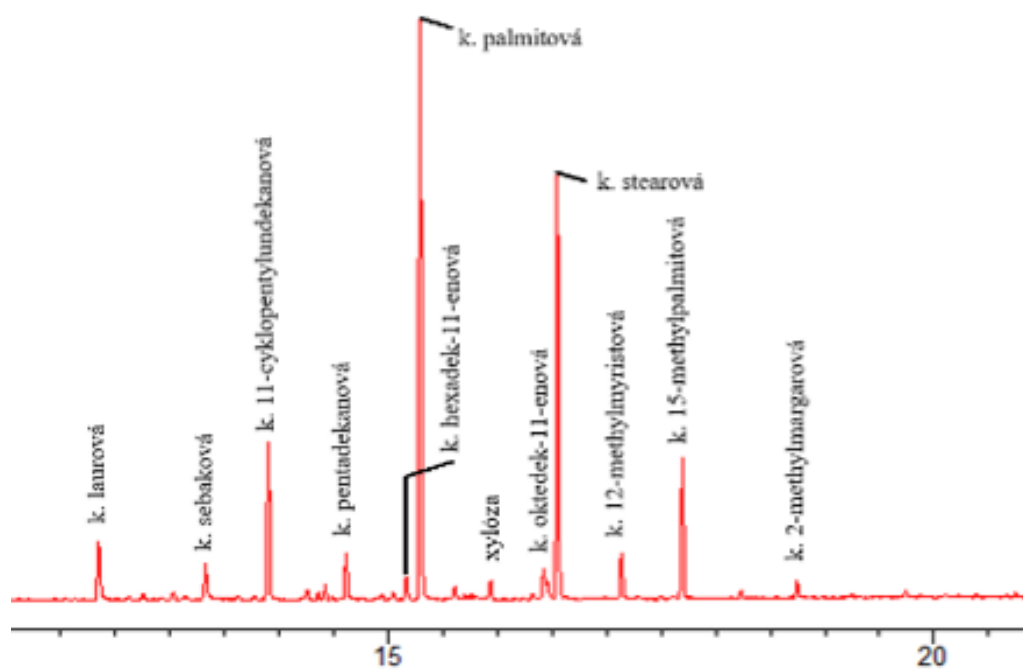


Obrázek 21: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.2.1 Methylace pomocí KOH v methanolu

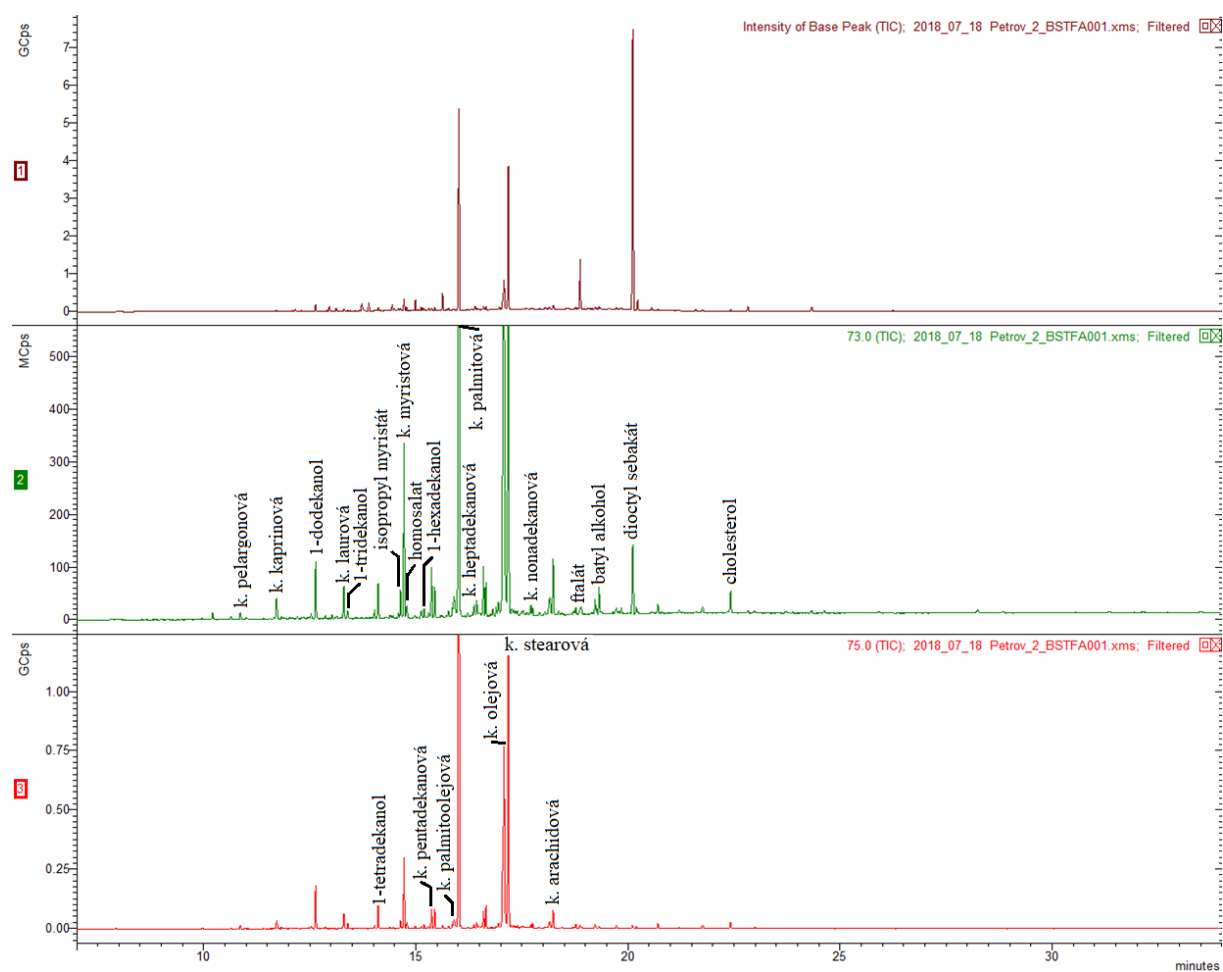


Obrázek 22: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Petrov_2 získaných derivatizační metodou KOH v MeOH



Obrázek 23: Detail identifikovaných sloučenin z Obrázku 15

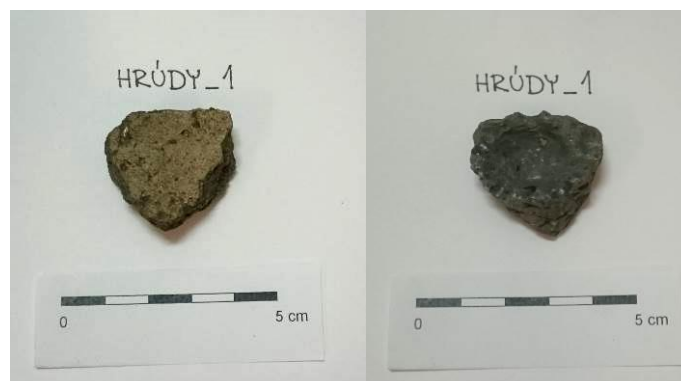
4.2.1 Silylace pomocí BSTFA



Obrázek 24: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Petrov_2 získaných derivatizační metodou pomocí BSTFA

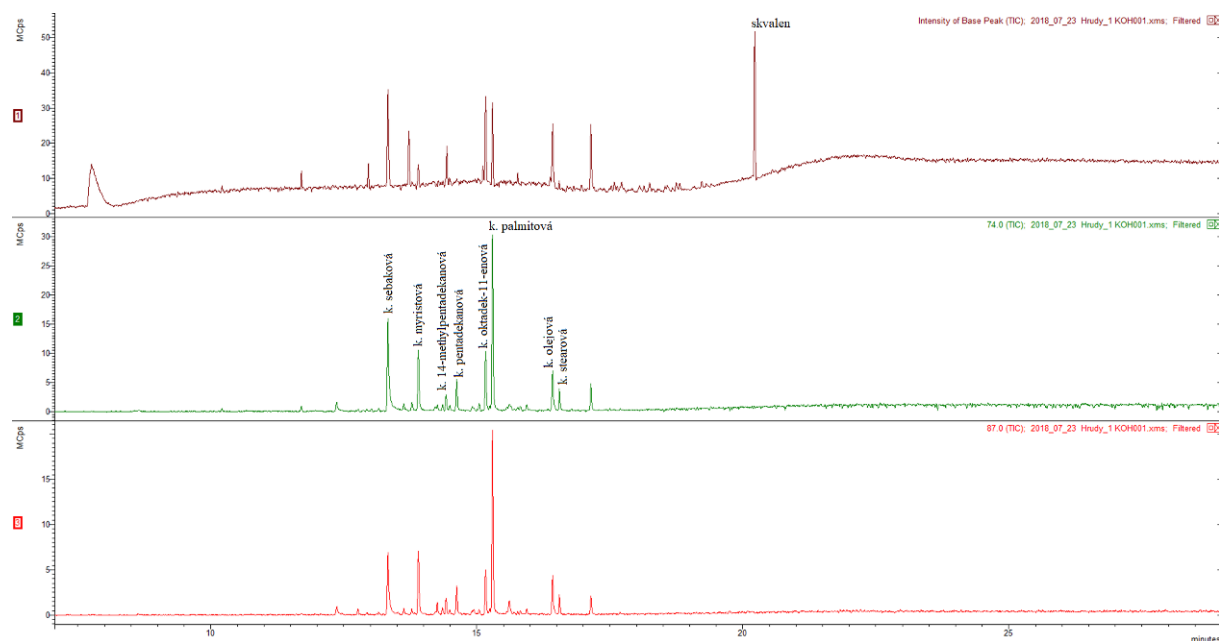
4.3 Vzorek č. 3 – Hrúdy_1

Menší fragment těla nádoby, ne příliš kvalitní.



Obrázek 25: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.3.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 26: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Hrúdy_1 získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

4.3.2 Silylace pomocí BSTFA

Měření nevyšlo z důvodu malého množství vzorku.

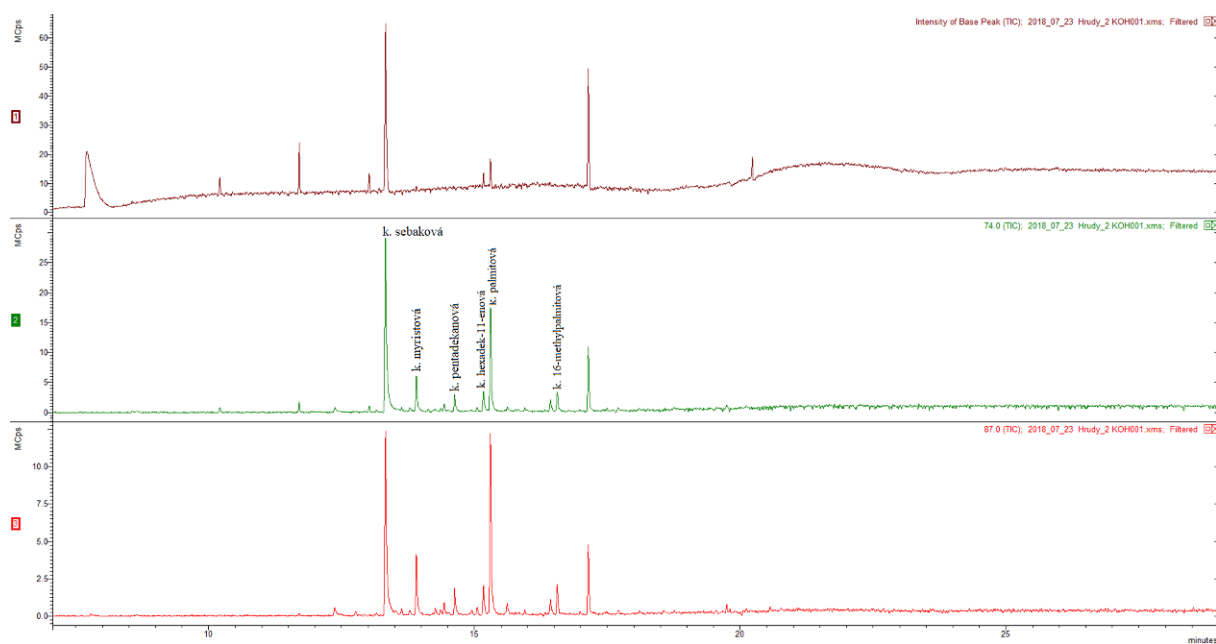
4.4 Vzorek č. 4 – Hrúdy_2

Malý fragment okraje nádoby s výzdobou, velké množství anorganických příměsí.



Obrázek 27: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.4.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 28: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Hrúdy_2 získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

4.4.2 Silylace pomocí BSTFA

Měření nevyšlo z důvodu malého množství vzorku.

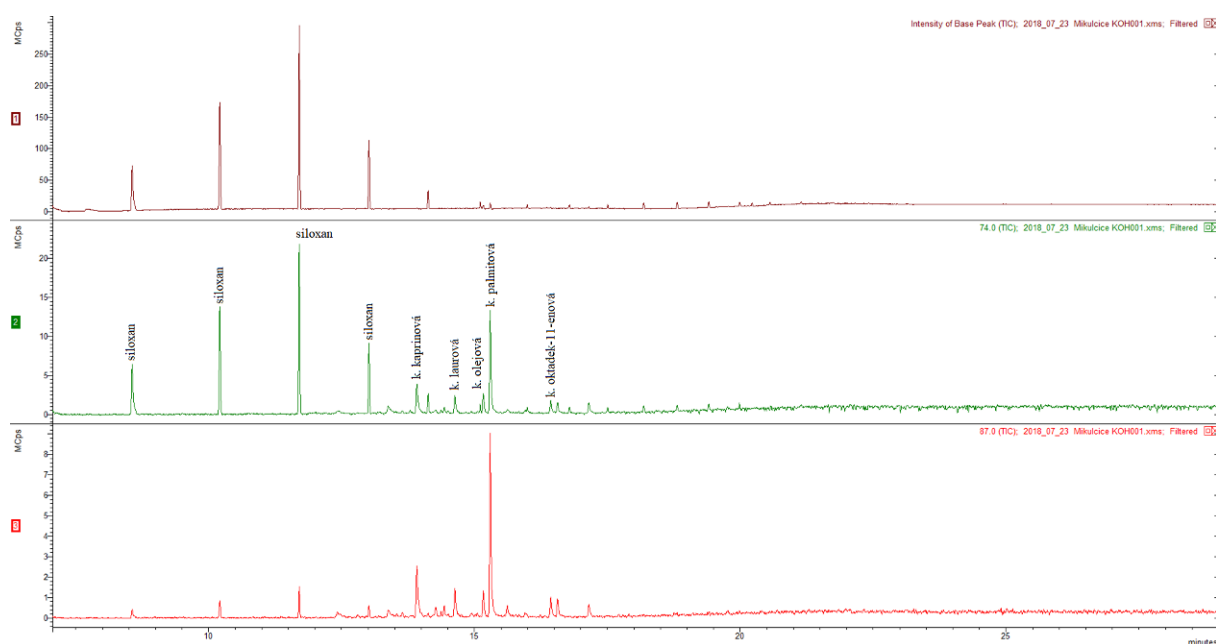
4.5 Vzorek č. 5 – Mikulčice_Valy

Zdobení fragment nádoby z části těsně pod okrajem nádoby.



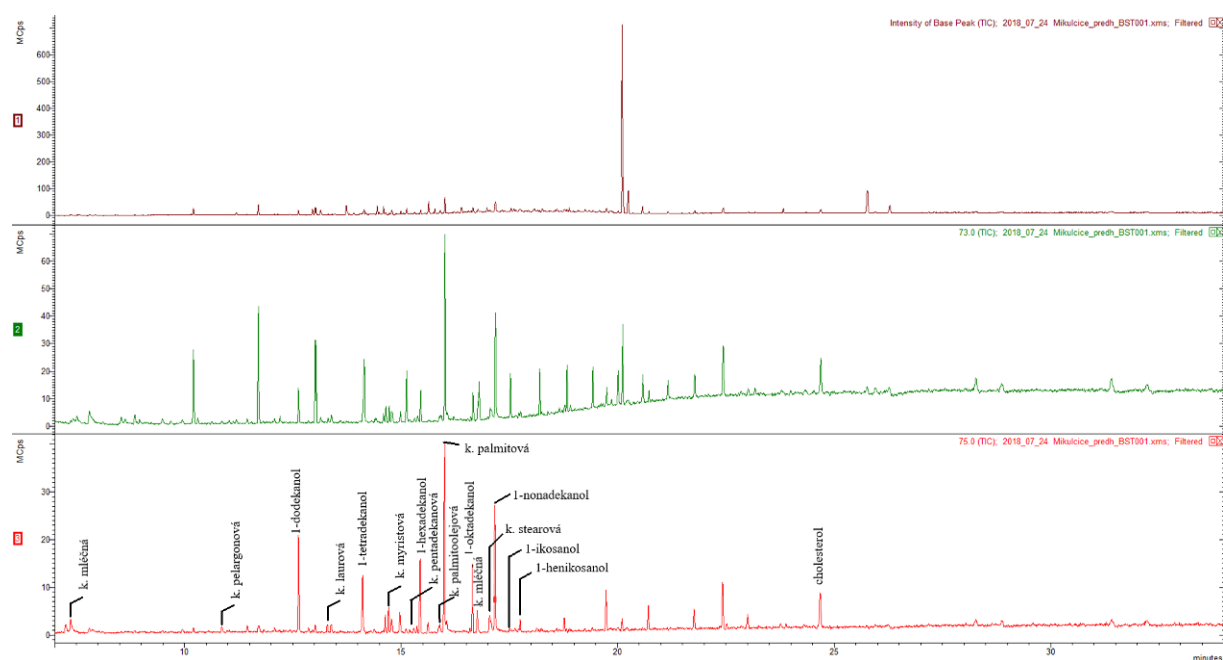
Obrázek 29: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.5.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 30: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Mikulčice_Valy získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

4.5.2 Silylace pomocí BSTFA



Obrázek 31: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Mikulčice_Valy získaných derivatizační metodou pomocí BSTFA

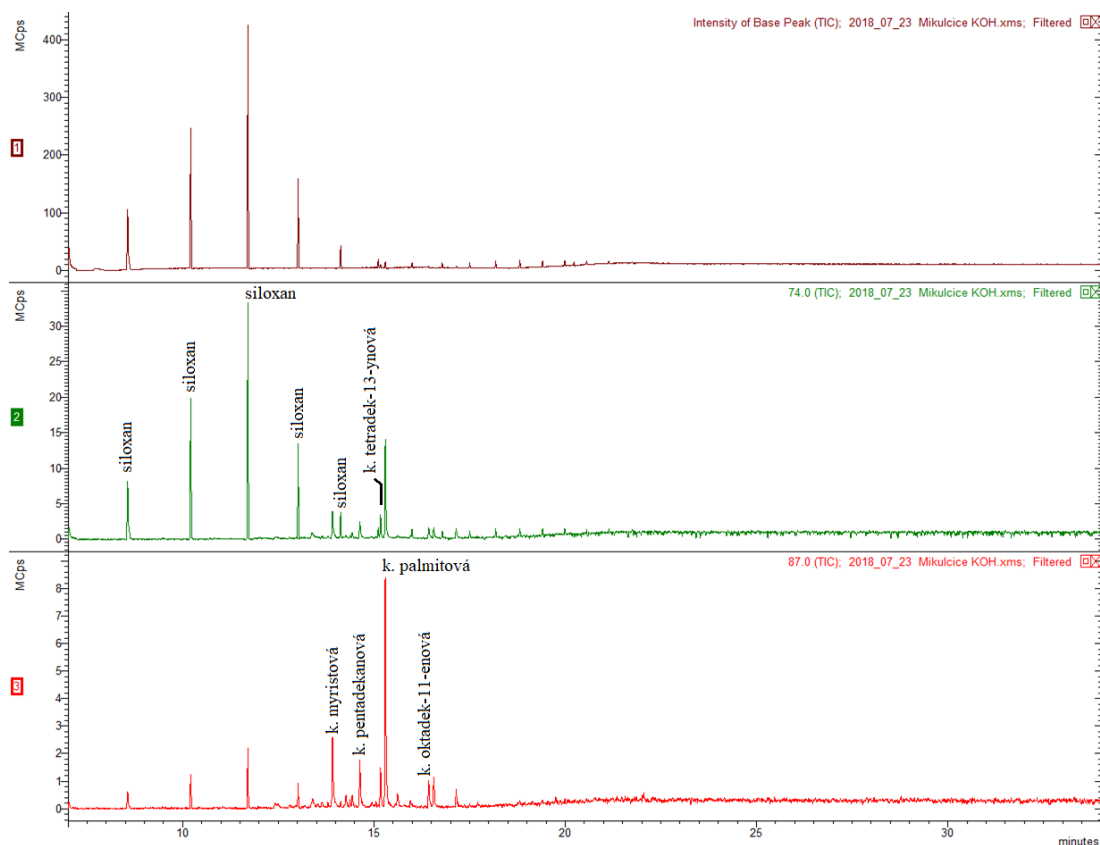
4.6 Vzorek č. 6 – Mikulčice_předhradí

Střep v horní části zdoben velkomoravskou vlnicí, pocházející z pod okraje nádoby.



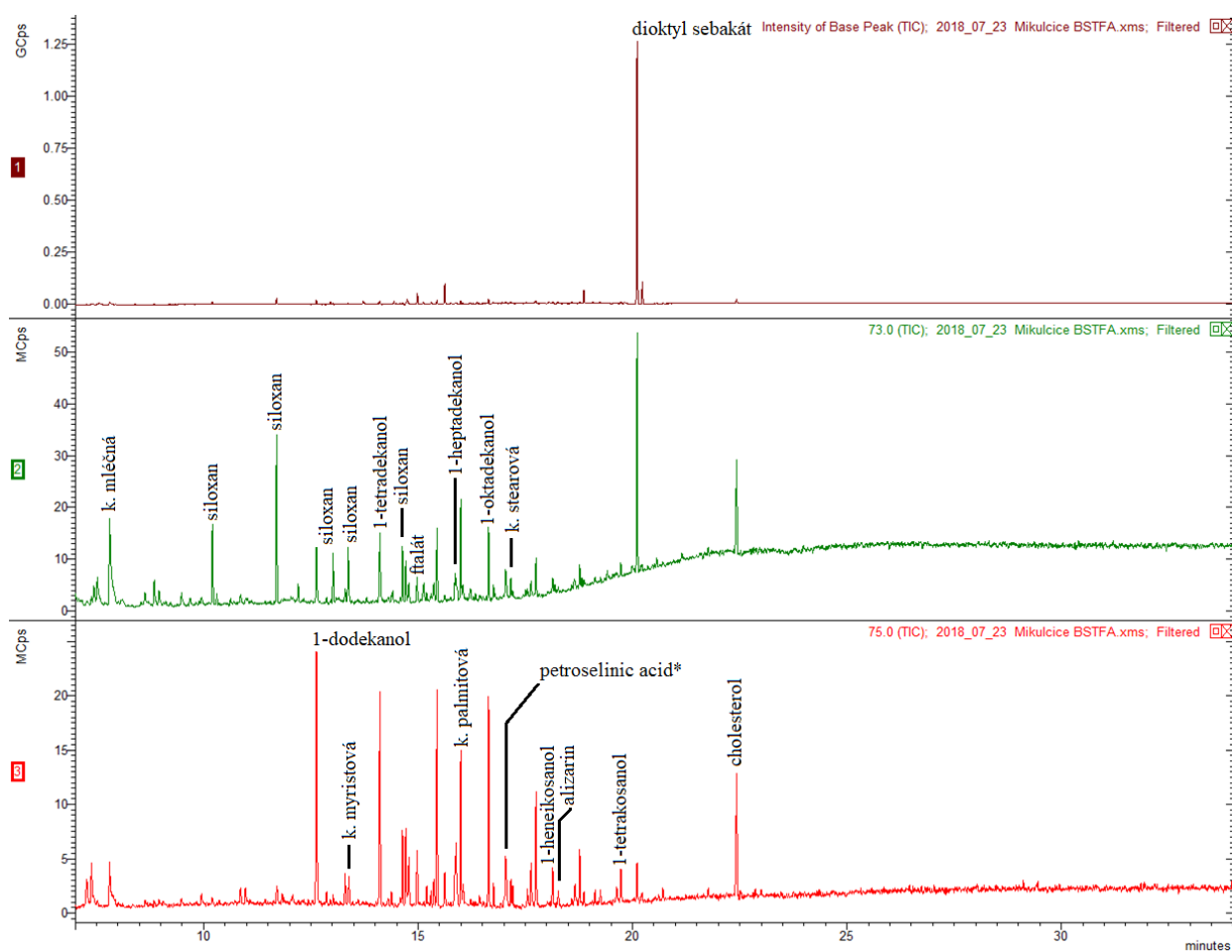
Obrázek 32: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.6.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 33: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Mikulčice_předhradí získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

4.6.2 Silylace pomocí BSTFA



Obrázek 34: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Mikulčice_předhradí získaných derivatizační metodou pomocí BSTFA

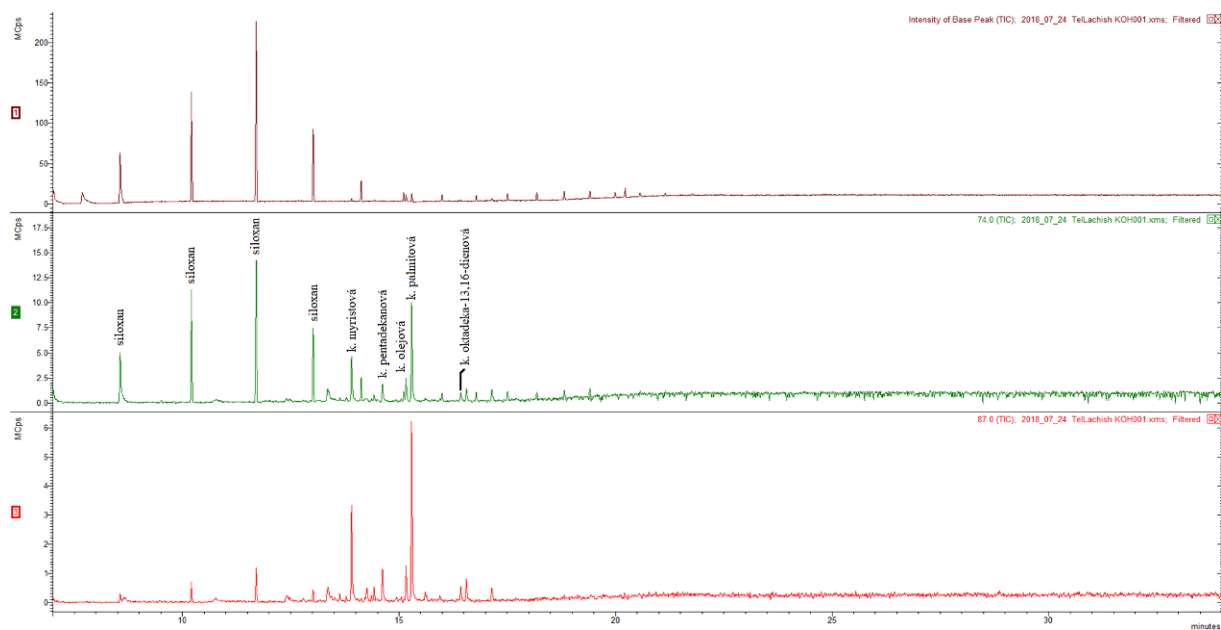
4.7 Vzorek č. 7 – Tel Lachisch

Část těla nádoby, velmi hutný střep, málo porézní, problém s broušením a získáním dostatečného množství keramického prášku.



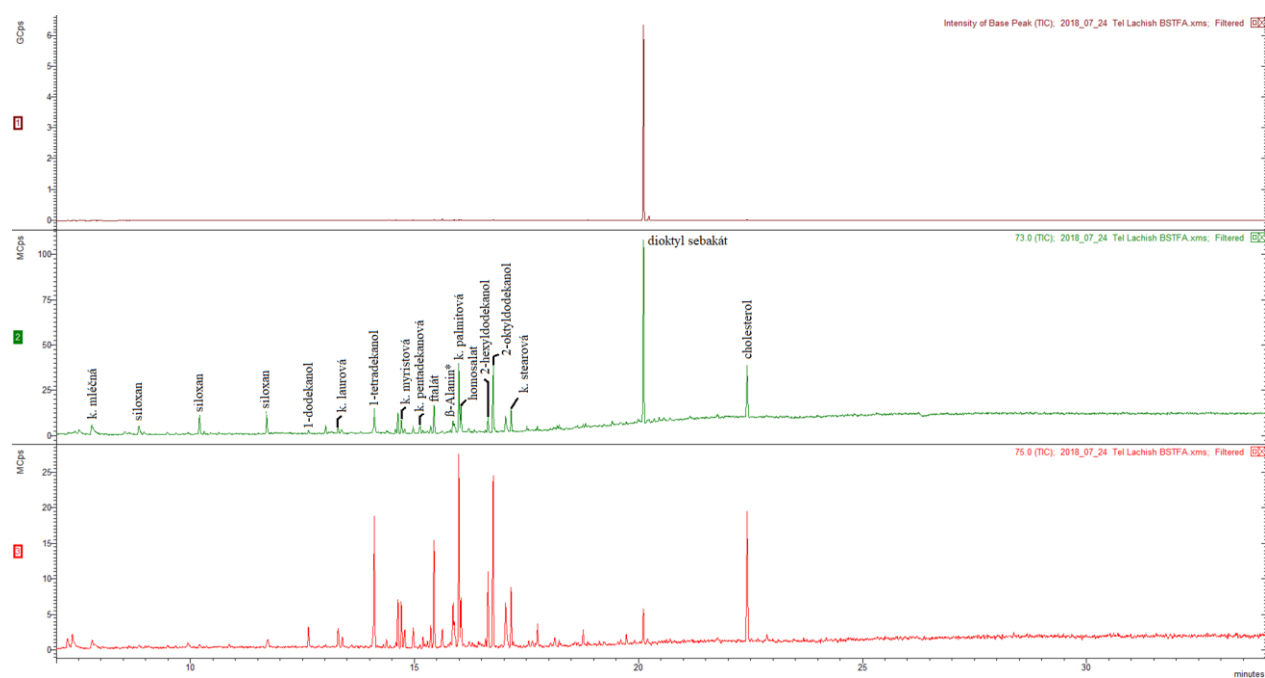
Obrázek 35: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.7.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 36: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Tel Lachish získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

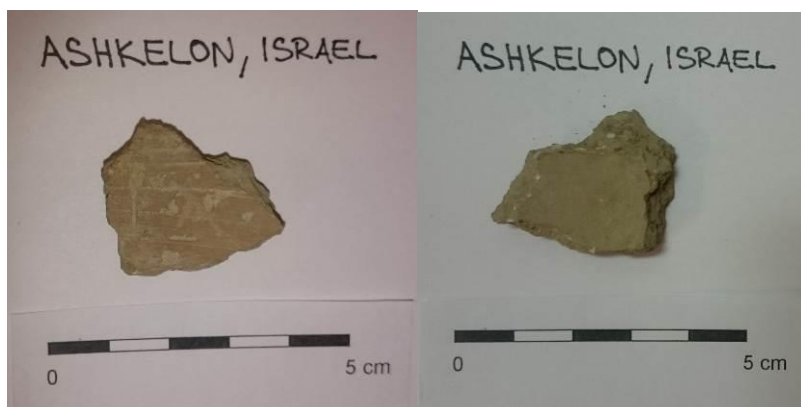
4.7.2 Silylace pomocí BSTFA



Obrázek 37: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Tel Lachish získaných derivatizační metodou pomocí BSTFA

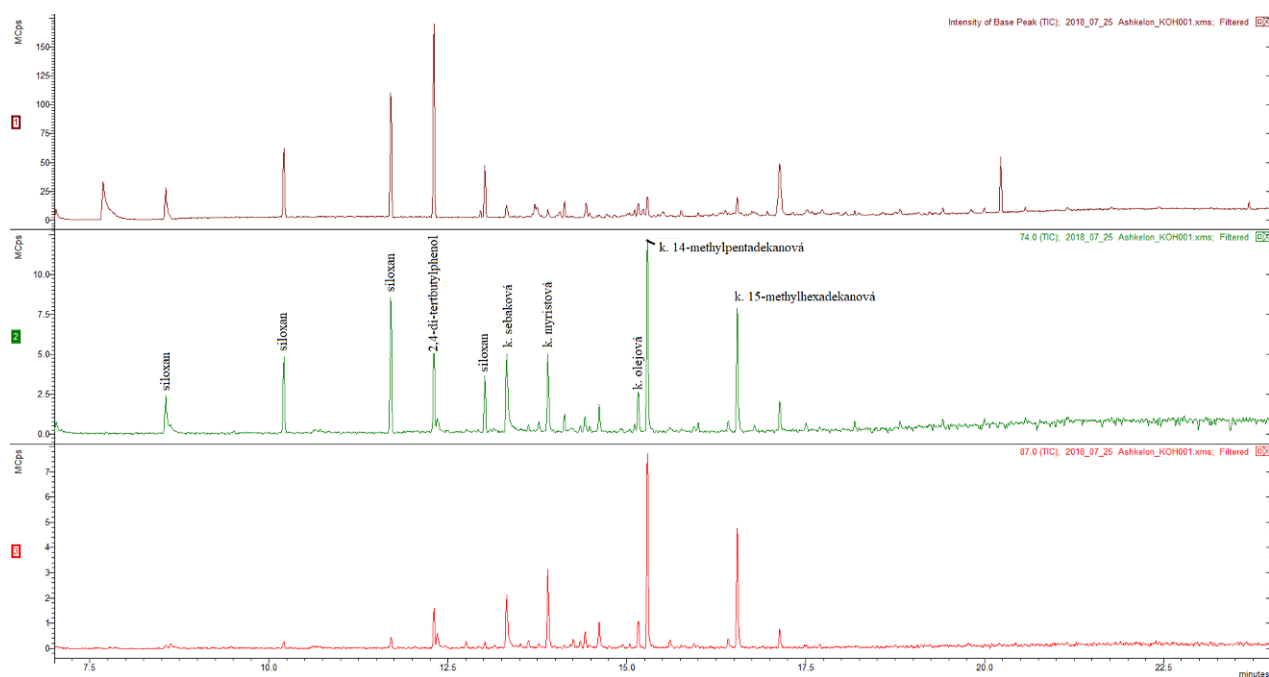
4.8 Vzorek č. 8 – Ashkelon

Střep z povrchového sběru, vnější povrch nese známky opotřebení v důsledku vnějších vlivů prostředí.



Obrázek 38: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.8.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 39: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Ashkelon získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

Intensity of Base Peak (TIC): 2018_07_25 Ashkalon_BSTFA001.xms; Filtered

Diethyl sebacát

trans-limonol

fosfát

fosforitan

73.0 (TIC): 2018_07_25 Ashkalon_BSTFA001.xms; Filtered

75.0 (TIC): 2018_07_25 Ashkalon_BSTFA001.xms; Filtered

1-dodekanol

1-tetradecanol

fosfát

homosalat

k. palmitová

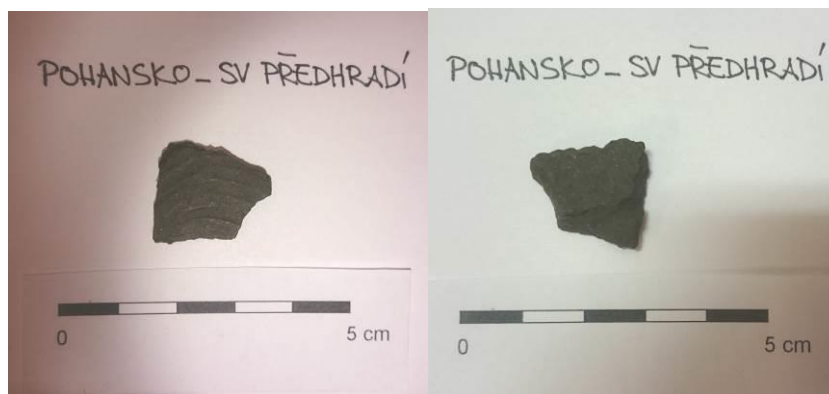
2-hexyldodekanol

minutes

42

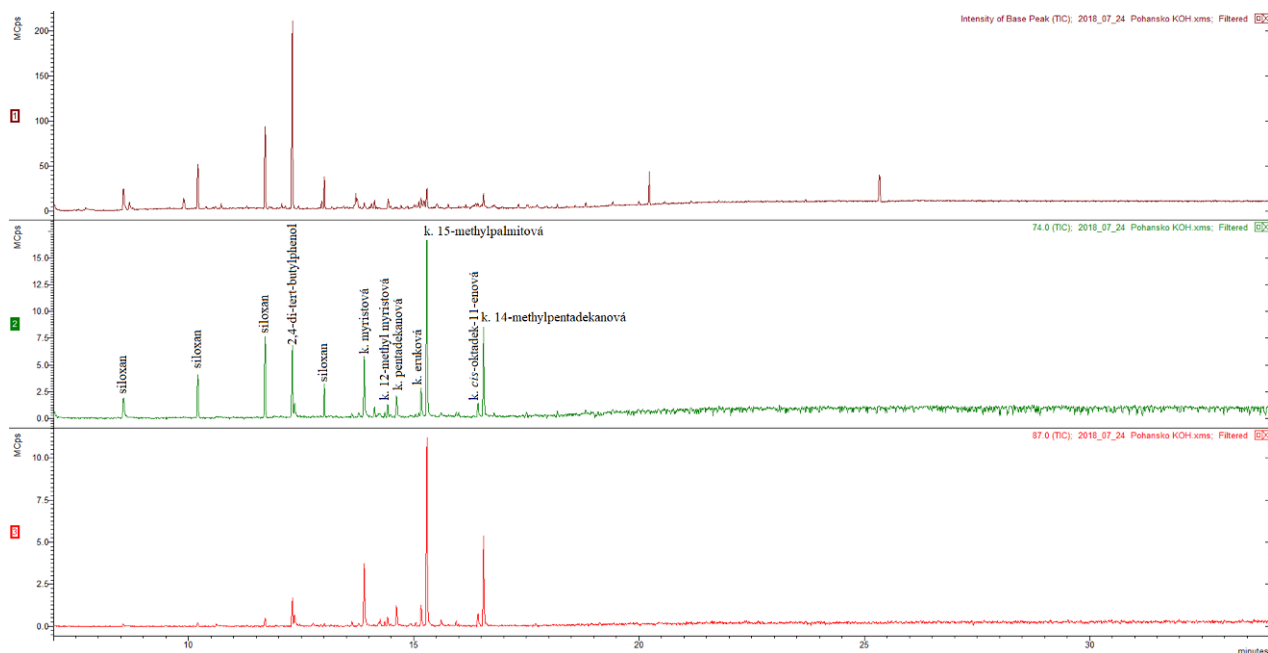
4.9 Vzorek č. 9 – Pohansko

Velmi malý fragment, podle zdobení vlnicí pochází zřejmě z části nádoby pod okrajem.



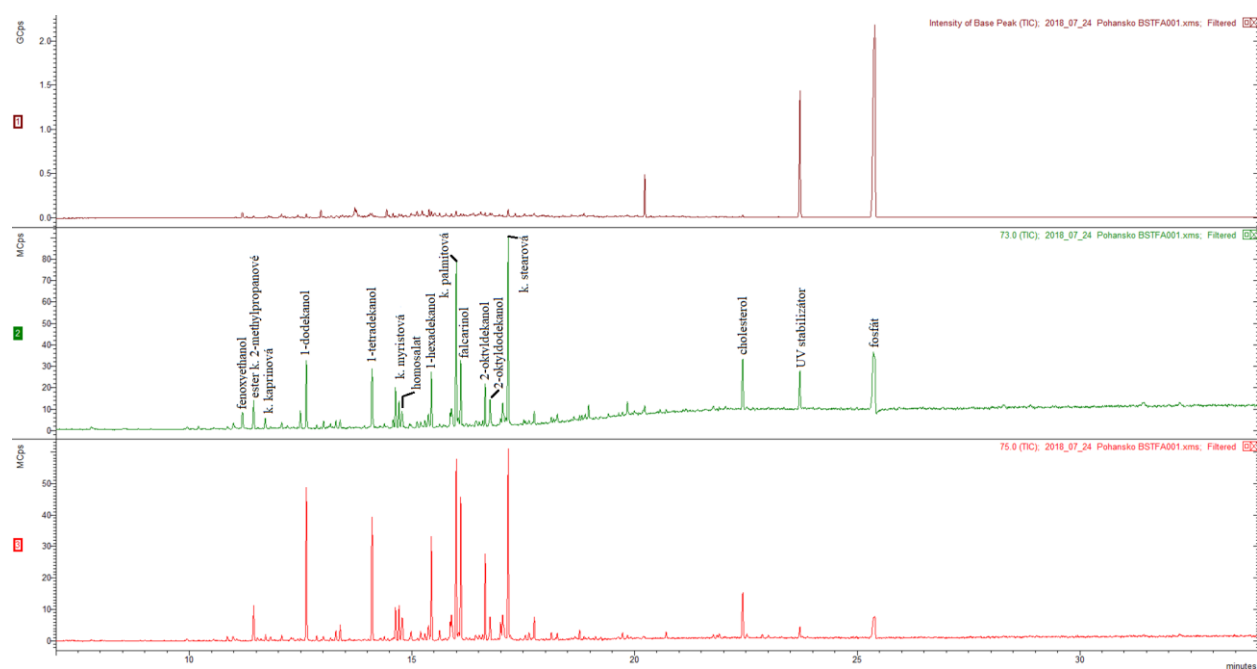
Obrázek 41: Vnější (vlevo) a vnitřní vybroušený (vpravo) povrch střepu

4.9.1 Methylace pomocí KOH v methanolu



Obrázek 42: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Pohansko získaných derivatizační metodou KOH v MeOH

4.9.2 Silylace pomocí BSTFA



Obrázek 43: Chromatogramy identifikovaných sloučenin ve vzorku Pohansko získaných derivatizační metodou pomocí BSTFA

5. DISKUSE

Tabulka 2: Shrnutí výsledků analýzy

Vzorek č.	Počet MK a jejich alkoholů	kontaminace	diagnostické sloučeniny	zajímavé
1	10	Isopropyl myristát, skvalen, DHMA		
2	22	Homosalat, cholesterol, isopropyl myristát	xylóza	
3	8	Skvalen		
4	6	-		
5	19	Cholesterol		
6	9	Cholesterol	Petroselinic acid	
7	12	Ftalát, homosalat, dioktyl sebacát, cholesterol		β -alanin
8	9	Ftalát, homosalat, <i>trans</i> -farnesol, fosfát, dioktyl sebacát, fosforitan		
9	18	Cholesterol, UV stabilizátor, fosfát	falcarinol	

Ve všech vzorcích byla nalezena organická rezidua související s předchozím uložením či zpracováváním potravy. Tato rezidua jsou zastoupena především mastnými kyselinami a od nich odvozenými alkoholy. Většinou se jedná o mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků – kyselina palmitová, stearová, olejová, myristová, eruková, sebaková, laurová, palmitoolejová, kaprinová. Jejich obsah v potravinách se různí a pro detailnější rekonstrukci jídelníčku by byly potřeba další analýzy – hlavně kvantifikace a následné izotopové analýzy.

Nicméně, co se týče raně středověkých a středověkých vzorků (vzorky č. 1 – 6, 9) z našeho území, tak si na základě nalezených mastných kyselin a srovnáním archeobotanických a archeozoologických dat lze představit, že strava se skládala jak z rostlinné potravy zastoupené hlavně obilovinami, z nichž dominovalo proso a pšenice (kyselina palmitová, olejová, palmitoolejová, myristová), tak zde byly zastoupeny i mléčné (kyselina kaprinová, mléčná, laurová) a živočišné tuky (kyselina mléčná, stearová). Pro živočišné tkáně jsou pak charakteristické kyseliny s lichým počtem uhlíků (kyselina pentadekanová, heptadekanová, pelargonová). Tyto mastné kyseliny se v tělech přeživkavců vyskytují v množství nad 5 %. [23][24][38]

Kyselina eruková se nachází také v brukvovitých, je tedy možné, že ve střepu z Pohanska se někdy nacházela nějaká brukvovitá rostlina. Například řepka a hořčice obsahuje 40-50 % kyseliny erukové z celkového množství MK. [39]

Dále je zajímavé nalezení mastného alkoholu zvaného falcarinol, která se nachází v kořenech mrkve, kde jej chrání před plísnovými chorobami. [40] Falcarinol byl nalezen také ve střepu z Pohanska a díky práci archeobotaničky z mikulčického hradiště (které je pohanskému současné) víme, že se na velkomoravských lokalitách nalézala planě rostoucí mrkev. Analýza tedy podporuje myšlenku, že byla sbírána a využívána při přípravách pokrmů. [38]

Dále byla ve střepu č. 6 z Mikulčic nalezena kyselina vyskytující se v petrželi (petrosilinic acid). Z archeobotanických nálezů jsou v Mikulčicích známa semena petržele v počtu 6 kusů. Odhaduje se, že její listy a nať byly využívány jako koření pro dochucování různých kaší. Zajímavá je také identifikace alizarinu, což je červené barvivo, které se používalo od starověku až do 19. stol. a získávalo se z mořeny barvířské. [38]

Ve všech vzorcích byla nalezena nějaká kontaminace, ať už z plastických sáčků, ve kterých byly střepy uchovány, či potu během vyzvedávání střepů (skvalen, cholesterol, DHMA – metabolit noradrenalinu [26], nebo opalovacích krémů či jiné kosmetiky (homosalat [41], isopropyl myristát [42]). Ve většině vzorků se nacházely i siloxany, což je kontaminace z kolony plynového chromatografu. Dále byla prokázána i kontaminace mikrobiální (2,4-di-*tert*-butylfenol – bakteriální metabolit [43]). Nejvyšší kontaminaci měl střep z Ashkelonu, což je logické, neboť pochází z povrchového sběru a je také nejstarší a tudíž byl vystaven vlivu prostředí nejdelší dobu. Obsahoval ftalát, fosfát a fosforitan (povrchová kontaminace z prostředí), *trans*-farnesol (kosmetika) [44], homosalat (opalovací krémy) a dioktyl sebacát (plastifikátor) [45]. Rovněž identifikaci cholesterolu můžeme brát spíše jako kontaminaci z rukou při manipulaci se střepem, protože cholesterol se při vaření v kombinaci s volnými mastnými kyselinami nedochovává [46].

Porovnáním výsledků z obou způsobů derivatizace se zdá úprava na TMS deriváty pomocí BSTFA o něco lepší, nicméně methylace pomocí KOH objevila látky, které pomocí BSTFA nebyly identifikovány. Do budoucna bych doporučila, pokud to bude možné, úpravu a identifikaci každého vzorku pomocí obou derivatizačních činidel, nicméně pokud by to například z ekonomických důvodů nebylo možné, rozhodně bych doporučila spíše metodu BSTFA.

6. ZÁVĚR

Analýza organických reziduí v archeologických keramických nádobách je komplexní věda, ve které nestačí poznatky pouze z jedné či druhé disciplíny. Literární řešerše se snažila poukázat na problematiku těchto analýz a předložit základní vhled do vědního oboru.

Na základě dostupného instrumentálního vybavení byla navržena metoda pro co možná nejcitlivější stanovení analytů z organických reziduí, která byla zaměřena hlavně na stanovení mastných kyselin ve vzorcích.

V experimentální části byl podrobně popsán laboratorní postup, který je doplněn i fotografickou dokumentací. Může tedy pomoci novým zájemcům o analýzy adsorbovaných reziduí s prvními laboratorními kroky, neboť dosud neexistuje žádný „manuál“, publikace či článek v češtině, kde by byly popsány jednotlivé kroky analýzy. Zároveň v některých případech nejsou tyto postupy uvedeny ani v zahraničních publikacích a v tom spatřuji největší přínos této práce.

Analýze bylo podrobeno devět reálných vzorků získaných od archeologických institucí během participace na výzkumech jimi vedenými. Jelikož se jednalo o první analýzy, nebyly na ně použity žádné vzácnější vzorky. Jedná se tedy o vzorky bez kontextů, ale pro potřeby prvních chemických analýz nejsou potřeba, neboť cílem práce bylo hlavně navrhnout optimální možnosti analýzy. Vzhledem k tomu, že se ve všech vzorcích podařilo identifikovat biomarkery dokládající přítomnost reziduí, lze metodu považovat za vhodnou i pro následné analýzy. Ovšem pro další analýzy navrhuji při měření na GC/MS již dopředu vybrat charakteristické hmoty či jiné rozmezí pro citlivější detekci a lepší softwarové zpracování a pokusit se zajistit i následné analýzy pomocí hmotnostního spektrometru IRMS.

Rovněž by bylo vhodné vypracovat metody vzorkování pro smysluplnější získávání a vyhodnocování informací z organických reziduí a také na eliminaci nežádoucí kontaminace způsobenou nezaškoleným personálem a nevhodnými skladovacími možnostmi.

Experimentální částí bylo prokázáno vše výše popsané – tedy, že opravdu záleží na materiálu, ze kterého je keramika vyrobena (střepy s poréznějším povrchem měly lepší výsledky), také na části nádoby, odkud fragment pochází (střepy blízko okraje obsahovaly více analytů). Dále bylo prokázáno, že dochází k degradačním procesům a tudíž je složité rekonstruovat původní obsah nádob, nebo to, jaké konkrétní potraviny v nich byly připravovány. Ve vzorcích, které neobsahovaly žádné diagnostické sloučeniny, se bez znalostí z dalších příbuzných oborů popisujících paleoprostředí zkoumaných lokalit a bez dalších (izotopických) analýz uspokojivějšího výsledku dobrat nelze. Jistým zpřesněním by mohlo být provedení kvantifikace získaných analytů, ale ta nebyla do rozsahu bakalářské práce zahrnuta.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PODBORSKÝ, Vladimír. *Úvod do studia archeologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2012. ISBN 978-80-210-6160-6.
- [2] PODBORSKÝ, Vladimír. *Dějiny pravěku a rané doby dějinné*. 3. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2006. ISBN 80-210-4153-6.
- [3] HLOŽEK, Martin. *Encyklopedie moderních metod v archeologii: archeometrie*. Praha: Libri, 2008. ISBN 978-80-7277-230-8.
- [4] BOUZEK, Jan. *Dějiny archeologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1976.
- [5] PROCHÁZKA, Rudolf a Marek PEŠKA. Základní rysy vývoje brněnské keramiky ve 12.-13./14. století: Příloha 1 Deskripční systém brněnské keramiky. In: *Přehled výzkumů 48* [online]. Brno: Archeologický ústav AV ČR, 2007, s. 143-270 [cit. 2019-05-31]. ISSN 1211-7250. Dostupné z: http://arub.avcr.cz/miranda2/export/sitesavcr/arub/prehled-vyzkumu/prehled-vydanych-cisel/files/PV48_studie_9_priloha_1.pdf
- [6] Organic Residue Analysis and Archaeology: Guidance for Good Practice. In: *Historic England* [online]. c2017 [cit. 2019-01-31]. Dostupné z: <https://www.historicengland.org.uk/images-books/publications/organic-residue-analysis-and-archaeology/>
- [7] HAVRÁNEK, Bohuslav. *Slovník spisovného jazyka českého*. 3. R-U. Praha: Československá akademie věd, 1966.
- [8] EVERSHED, R. P. ORGANIC RESIDUE ANALYSIS IN ARCHAEOLOGY: THE ARCHAEOLOGICAL BIOMARKER REVOLUTION*. *Archaeometry* [online]. 2008, 50(6), 895-924 [cit. 2019-02-11]. DOI: 10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x. ISSN 0003813x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x>
- [9] JERKOVIĆ, Igor, Zvonimir MARIJANOVIĆ, Mirko GUGIĆ a Marin ROJE. Chemical Profile of the Organic Residue from Ancient Amphora Found in the Adriatic Sea Determined by Direct GC and GC-MS Analysis. *Molecules* [online]. 2011, 16(9), 7936-7948 [cit. 2019-05-31]. DOI: 10.3390/molecules16097936. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/16/9/7936>
- [10] PAVELKA, Jaroslav a Pavel VAREKA. Příspěvek k poznání středověké stravy ve vrcholném a pozdním středověku. První výsledky analýzy potravinových zbytků na keramice v Čechách. *Kuděj. Časopis pro kulturní dějiny*. Plzeň: Západočeská univerzita v Plzni, 2008, 10(1-2), 98-109.
- [11] Organic Residue Analysis and Archaeology: Supporting Information. In: *Historic England* [online]. c2017 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <https://www.historicengland.org.uk/images-books/publications/organic-residue-analysis-and-archaeology/>

- [12] EVERSLED, Richard P., Zvonimir MARIJANOVIĆ, Mirko GUGIĆ a Marin ROJE. Experimental approaches to the interpretation of absorbed organic residues in archaeological ceramics. *World Archaeology* [online]. 2008, **40**(1), 26-47 [cit. 2019-05-31]. DOI: 10.1080/00438240801889373. ISSN 0043-8243. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00438240801889373>
- [13] KAŁUŻNA-CZAPLIŃSKA, Joanna, Angelina ROSIAK, Marzena KWAPIŃSKA a Witold KWAPIŃSKI. Different Analytical Procedures for the Study of Organic Residues in Archeological Ceramic Samples with the Use of Gas Chromatography-mass Spectrometry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **46**(1), 67-81 [cit. 2019-02-19]. DOI: 10.1080/10408347.2015.1008130. ISSN 1040-8347. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2015.1008130>
- [14] JIRÁSKOVÁ, Lucie. Kanopy v době Staré říše. *Pražské egyptologické studie*. Praha: Univerzita Karlova, Filozofická fakulta, 2014, **2014**(XIII), 49-55. ISSN 1214-3189.
- [15] NEWMAN, Richard. Technical Report: Organic Residues from Egyptian Blue Anhydrite Duck Flasks and Other Anhydrite Vessels. *Metropolitan Museum Journal*. The Metropolitan Museum of Art, 1998, **33**, 49-55. DOI: 10.2307/1513006. ISSN 0077-8958. Dostupné také z: <http://www.journals.uchicago.edu/doi/10.2307/1513006>
- [16] ROFFLET-SALQUE, M., et al. From the inside out: Upscaling organic residue analyses of archaeological ceramics, *Journal of Archaeological Science: Reports* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.04.005>
- [17] PECCI, Alessandra, Eva DEGL'INNOCENTI, Gianluca GIORGI, Miguel Ángel CAU ONTIVEROS, Federico CANTINI, Eva SOLANES POTRONY, Carmen ALÓS a Domenico MIRIELLO. Organic residue analysis of experimental, medieval, and post-medieval glazed ceramics. *Archaeological and Anthropological Sciences* [online]. 2016, **8**(4), 879-890 [cit. 2017-02-19]. DOI: 10.1007/s12520-015-0262-3. ISSN 1866-9557. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12520-015-0262-3>
- [18] Organic Residue Analysis and Archaeology: Supporting Information. In: *Historic England* [online]. c2017 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <https://www.historicengland.org.uk/images-books/publications/organic-residue-analysis-and-archaeology/>
- [19] BONDETTI, Manon, Sofia SCOTT, Alexandre LUCQUIN, John MEADOWS, Olga LOZOVSKAYA, Ekaterina DOLBUNOVA, Peter JORDAN a Oliver E. CRAIG. Fruits, fish and the introduction of pottery in the Eastern European plain: Lipid residue analysis of ceramic vessels from Zamostje 2. *Quaternary International* [online]. 2019, **40**(1), 26-47 [cit. 2019-05-31]. DOI: 10.1016/j.quaint.2019.05.008. ISSN 10406182. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1040618218312862>
- [20] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.

- [21] Palmitic acid. *Pubchem* [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitic-acid>
- [22] Stearic acid. *Pubchem* [online]. [cit. 2019-04-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Stearic-acid>
- [23] VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [24] BULKOVÁ, Věra. *Rostlinné potraviny*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2011. ISBN 978-80-7013-532-7.
- [25] MALAINEY, Mary E. *A consumer's guide to archaeological science: analytical techniques*. New York: Springer, c2011. Manuals in archaeological method, theory, and technique. ISBN 978-1-4419-5704-7. Dostupné také z: https://enciklopediamoderne.files.wordpress.com/2014/09/mary-e-malainey-a-consumer_s-guide-to-archaeological-science.pdf
- [26] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opr. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 80-200-0600-1.
- [27] ORNA, Jiří. *Keramická produkce města Plzně v období 14. a 15. století*. Praha: Ivan Fojt v nakl. Scientia, 2011. ISBN 978-80-86960-68-5.
- [28] MALAINEY, Mary E. *A Consumer's Guide to Archaeological Science*. 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419-5704-7.
- [29] PAPAKOSTA, Vasiliki, Rienk H. SMITTENBERG, Kevin GIBBS, Peter JORDAN a Sven ISAKSSON. Extraction and derivatization of absorbed lipid residues from very small and very old samples of ceramic potsherds for molecular analysis by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and single compound stable carbon isotope analysis by gas chromatography–combustion–isotope ratio mass spectrometry (GC–C–IRMS). *Microchemical Journal* [online]. 2015, **123**, 196-200 [cit. 2018-02-01]. DOI: 10.1016/j.microc.2015.06.013. ISSN 0026265x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X15001356>
- [30] PAVELKA, Jaroslav, Ladislav SMEJDA, Radovan HYNEK a Stepanka HRDLICKOVA KUCKOVA. Immunological detection of denatured proteins as a method for rapid identification of food residues on archaeological pottery. *Journal of Archaeological Science* [online]. 2016, **73**, 25-35 [cit. 2016-11-27]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2016.07.004>
- [31] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 80-214-1742-0.
- [32] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
- [33] REGERT, M. Analytical strategies for discriminating archeological fatty substances from animal origin. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2011, **30**(2), 177-220 [cit.

- 2018-05-15]. DOI: 10.1002/mas.20271. ISSN 02777037. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mas.20271>
- [34] MAYYAS, Abdulraouf. S. ORGANIC RESIDUES IN ANCIENT POTTERY SHERDS FROM SITES IN JORDAN. *MEDITERRANEAN ARCHAEOLOGY & ARCHAOMETRY* [online]. 2018, **18**(1), - [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: [http://maajournal.com/Issues/2018/Vol18-1/6_Mayyas%2018\(1\).pdf](http://maajournal.com/Issues/2018/Vol18-1/6_Mayyas%2018(1).pdf)
- [35] PELIKÁN, Jiří Boris a Vladimír SAKAŘ. Zjišťování druhu paliva v římských kahanech. *Archeologické rozhledy*. 1956, **8**(4), 533-534. ISSN 0323-1267.
- [36] PÁGO, L. Zjišťování paliva v římském kahanu. *Archeologické rozhledy*. 1963, **15**, 72-74.
- [37] KÁBELOVÁ, Božena, Ivana PILÁTOVÁ a Zdeňka HANÁKOVÁ. *Laboratorní technika II*. Brno: VUTIUM, 1999. ISBN 80-214-1450-2.
- [38] LÁTKOVÁ, Michaela. Rostliny a výživa velkomoravských Mikulčic. Brno: Archeologický ústav AV ČR Brno, 2019. Mikulčice - průvodce. ISBN 978-80-7524-022-4.
- [39] Kyselina eruková. *Bezpečnost potravin AZ* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92535.aspx>
- [40] Falcarinol. *Bezpečnost potravin AZ* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92383.aspx>
- [41] Homosalate. *Složení-kosmetiky* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <https://www.slozeni-kosmetiky.cz/homosalate>
- [42] Isopropyl myristate. *BIOOO.CZ* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/isopropyl-myristate/?>
- [43] 2,4-Di-Tert-Butylphenol (Compound). *Pubchem* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Di-tert-butylphenol
- [44] Farnesol. *BIOOO.CZ* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: <https://encyklopedie.biooo.cz/vyhledat-slozeni/farnesol/?>
- [45] Bis(2-ethylhexyl) sebacate. *Pubchem* [online]. [cit. 2019-05-25]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bis_2-ethylhexyl_-sebacate
- [46] HAMMANN, Simon, Lucy J.E. CRAMP, Mathilda WHITTLE a Richard P. EVERSLED. Cholesterol degradation in archaeological pottery mediated by fired clay and fatty acid pro-oxidants. *Tetrahedron Letters* [online]. 2018, **59**(50), 4401-4404 [cit. 2019-05-25]. DOI: 10.1016/j.tetlet.2018.10.071. ISSN 00404039. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403918313121>

8. SEZNAM ZKRATEK

aDNA	ancient DNA (starobylá DNA)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
GC/MS	Plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií
IRMS	Isotope ratio mass spektrometry
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
KOH	Hydroxid draselný
MeOH	Methanol
MK	Mastné kyseliny
MMK	Methylestery mastných kyselin
TAG	Triacylglycerol
TMS	Trimethylsilyl
NMR	Nukleární magnetická rezonance